

# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

INTERAKCE FOSFOLIPIDŮ S POLYELEKTROLYTY VE VODNÉM  
PROSTŘEDÍ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

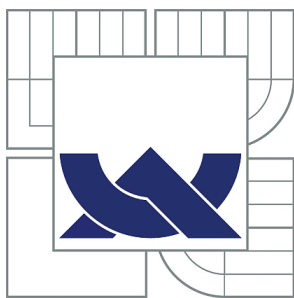
MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

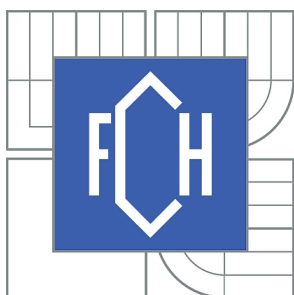
Bc. IVA MAIVALDOVÁ

BRNO 2010



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY



FAKULTA CHEMICKÁ

ÚSTAV CHEMIE POTRAVIN A BIOTECHNOLOGIÍ

FACULTY OF CHEMISTRY

INSTITUTE OF FOOD SCIENCE AND BIOTECHNOLOGY

# INTERAKCE FOSFOLIPIDŮ S POLYELEKTROLYTY VE VODNÉM PROSTŘEDÍ

INTERACTION OF PHOSPHOLIPIDS WITH POLYELECTROLYTES IN AQUEOUS MEDIUM

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. IVA MAIVALDOVÁ

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

doc. Ing. MARTINA KLUČÁKOVÁ,  
Ph.D.

BRNO 2010



Vysoké učení technické v Brně  
**Fakulta chemická**  
Purkyňova 464/118, 61200 Brno 12

## Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	<b>FCH-DIP0390/2009</b>	Akademický rok: <b>2009/2010</b>
Ústav:	Ústav chemie potravin a biotechnologií	
Student(ka):	<b>Bc. Iva Maivaldová</b>	
Studijní program:	Chemie a technologie potravin (N2901)	
Studijní obor:	Potravinářská chemie a biotechnologie (2901T010)	
Vedoucí práce	<b>doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.</b>	
Konzultanti:	Ing. Filip Mravec, Ph.D.	

### Název diplomové práce:

Interakce fosfolipidů s polyelektrolyty ve vodném prostředí

### Zadání diplomové práce:

Prostudovat interakce fosfolipid-hyaluronan jako modelový polyelektrolyt s ohledem na možnost využití při přípravě nosičových systémů biologicky aktivních látek.

### Termín odevzdání diplomové práce: 14.5.2010

Diplomová práce se odevzdává ve třech exemplářích na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

-----  
Bc. Iva Maivaldová  
Student(ka)

-----  
doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.  
Vedoucí práce

-----  
doc. Ing. Jiřina Omelková, CSc.  
Ředitel ústavu

V Brně, dne 1.12.2009

-----  
prof. Ing. Jaromír Havlica, DrSc.  
Děkan fakulty

## ABSTRAKT

Tato práce je zaměřena na stanovení agregačního chování vybraných fosfolipidů (lecitin; 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin) ve vodě a jeho ovlivnění přidavkem nativního hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech a koncentracích. Toto chování bylo sledováno pomocí fluorescenční spektroskopie za využití pyrenu a perylenu jako fluorescenčních sond schopných penetrovat do hydrofobních kavit formovaných agregátů. Byla stanovena kritická agregační koncentrace a koncentrace odpovídající počátku agregace lecitinu. Pro 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin bylo možno stanovit pouze počátek agregace. Hodnoty tohoto parametru si pro lecitin a 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin řádově odpovídají. Bylo zjištěno, že přidavek nativního hyaluronanu má pouze v některých systémech nepatrný vliv na agregační chování vybraných fosfolipidů.

## ABSTRACT

This diploma thesis is focused on determination of aggregation behavior of selected phospholipids (lecithin; 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine) in water and on the effect of native hyaluronan addition of various molecular weights and concentrations on this behavior. The behavior has been investigated with fluorescence spectroscopy using pyrene and perylene as fluorescence probes being able to penetrate into hydrophobic cavities of formed aggregates. Critical aggregation concentration and the concentration at which lecithin begins to aggregate have been determined. Regarding 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine, it was possible to determine only the beginning of aggregation value. The values of this parameter for lecithin and for 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycerol-3-phosphocholine correspond in the order. It has been investigated, that the addition of native hyaluronan has only in some systems slight effect on the aggregate behavior of selected phospholipids.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Fosfolipidy, hyaluronan, fluorescence, lecitin, DPPC, pyren, perylen

## KEYWORDS

Phospholipids, hyaluronan, fluorescence, lecithin, DPPC, pyrene, perylene

MAIVALDOVÁ, I. *Interakce fosfolipidů s polyelektrolyty ve vodném prostředí*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2010. 67 s. Vedoucí diplomové práce doc. Ing. Martina Klučáková, Ph.D.

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....  
podpis studentky

## PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce doc. Martině Klučákové, Ph.D. a mému konzultantovi Ing. Filipovi Mravcovi, Ph.D. za odborný dohled, vstřícnost a pomoc při řešení problémů. V neposlední řadě patří také můj velký dík Ing. Tereze Halasové za nápady, cenné rady, připomínky a trpělivost během celé této práce.

# OBSAH

1. ÚVOD .....	7
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	8
2.1 Kyselina hyaluronová.....	8
2.1.1 Chemická struktura HA.....	8
2.1.2 Struktura polymeru.....	8
2.1.3 Struktura hyaluronanu v roztoku.....	9
2.1.4 Výskyt a průmyslová výroba hyaluronanu.....	10
2.1.5 Biosyntéza hyaluronanu .....	10
2.1.6 Biotransformace .....	11
2.1.6.1 Obrat.....	11
2.1.6.2 Katabolismus.....	12
2.1.7 Využití kyseliny hyaluronové .....	12
2.2 Lipidy .....	13
2.2.1 Základní rozdělení lipidů .....	13
2.2.1.1 Hydrolyzovatelné lipidy.....	14
2.2.1.2 Nehydrolyzovatelné lipidy .....	15
2.2.2 Biologické funkce lipidů .....	15
2.2.3 Mastné kyseliny a tuky.....	15
2.2.4 Membránové lipidy .....	17
2.2.4.1 Fosfolipidy .....	17
2.2.4.2 Glykolipidy.....	18
2.2.4.3 Cholesterol .....	20
2.2.5 Amfifilní membránové lipidy.....	20
2.2.5.1 Liposomy.....	22
2.2.6 Membránové proteiny .....	22
2.2.7 Fluidita membrán .....	23
2.2.8 Asymetrie membrán .....	24
2.3 Luminiscence .....	24
2.3.1 Fotoluminiscence .....	25
2.3.1.1 Vznik fotoluminiscenčních spekter.....	25
2.3.2 Vlastní fluorescence .....	27
2.3.3 Nevlastní fluorescence .....	27
2.3.3.1 Fluorescenční značky .....	27
2.3.3.2 Fluorescenční sondy .....	27
2.3.4 Excimer .....	30
2.3.5 Instrumentace .....	30
2.3.5.1 Fluorescenční spektrometr .....	30
2.4 Současný stav řešené problematiky.....	31
3. MATERIÁLY A METODY .....	38
3.1 Použité chemikálie .....	38
3.2 Metody .....	38
3.2.1 Příprava vzorků .....	38
3.2.2 Měření a vyhodnocení dat .....	39
3.2.2.1 Pyren.....	39

3.2.2.2 Perylen.....	40
3.2.3 Korekce .....	41
4. VÝSLEDKY A DISKUZE .....	44
4.1 Lecitin.....	44
4.1.1 Stanovení kritické agregační koncentrace lecitinu ve vodě .....	44
4.1.2 Sledování agregačního chování lecitinu v přítomnosti nativního hyaluronanu .....	46
4.2 DPPC .....	50
4.2.1 Stanovení kritické agregační koncentrace DPPC ve vodě .....	50
4.2.2 Sledování agregačního chování DPPC v přítomnosti nativního hyaluronanu .....	52
4.2.2.1 Porovnání parametrů pyrenových dat .....	52
4.2.2.2 Porovnání pyren - perylen .....	54
4.2.2.3 Perylen.....	55
4.3 Porovnání počátků agregace lecitinu a DPPC.....	59
5. ZÁVĚR.....	60
6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ .....	62
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	65
8. SEZNAM PŘÍLOH .....	66
9. PŘÍLOHY.....	67
9.1 Příloha 1 .....	67

# 1. ÚVOD

Tato práce je zaměřena na využití amfifilních molekul v kombinaci s biodegradabilním polymerem k tvorbě koloidního agregátu schopného rozpouštět a nést hydrofobní aktivní látky. Zvolenými amfifilními molekulami jsou fosfolipidy. Kyselina hyaluronová je vybrána jako modelový biopolymer.

Hyaluronová kyselina (HA) je přirozeně se vyskytující biopolymer. Tento lineární polyanionický polysacharid je tvořený disacharidovými jednotkami složenými z *N*-acetyl-D-glukosaminu a D-glukuronové kyseliny. Hyaluronát sodný, převládající forma ve fyziologickém pH, a hyaluronová kyselina jsou společně nazývány jako **hyaluronan**, běžně se používají oba názvy polymeru. Vyskytuje se téměř ve všech biologických tekutinách a tkáních. Její fyzikálně-chemické a biologické vlastnosti nabízejí široké spektrum možností využití tohoto biopolymeru jak v průmyslu, tak v lékařských vědách. Výhodné je použití HA v kosmetice a kosmetické chirurgii. Jako fyziologická komponenta tkání nemá velké nežádoucí účinky a shoda v chemickém složení HA produkované streptokoky s lidskou umožňuje její aplikaci bez předchozího testování bezpečnosti na zvířatech. Uplatnění hyaluronanu a jeho derivátů je přínosem pro povrch pokožky v důsledku jeho hydratačních, antioxidačních a protizánětlivých účinků. Dále zpomaluje stárnutí pokožky, obnovuje epidermis a podporuje epidermální integritu. Všechny tyto účinky závisí na molekulové hmotnosti a koncentraci hyaluronanu v konečném preparátu ošetřujícím pokožku. Díky svým unikátním vlastnostem našla HA již řadu uplatnění v nejrůznějších medicínských odvětvích: v revmatologii, oftalmologii, diabetologii, farmaceutické technologii a dalších oblastech, například při hojení ran. Její potenciál coby léčivé látky je veliký a možnosti dalšího využití při terapii chorob jsou stále předmětem zkoumání. Stejně tak jsou zkoumány možnosti jejího využití jakožto farmaceutického poloproduktu pro tvorbu nových derivátů s vlastnostmi nosičů terapeutických látek.

Molekuly, které mají části s hydrofilními a hydrofobními vlastnostmi, se označují jako amfifilní či amfipatické. Mezi takovéto molekuly se řadí i fosfolipidy. Fosfolipidy jsou lipidy, které obsahují mimo mastných kyselin a alkoholu i zbytek kyseliny fosforečné. Často obsahují i dusíkaté báze a další substituenty. Tyto amfipatické molekuly jsou objekty, v nichž se hydrofobní konce tvořené mastnými kyselinami snaží minimalizovat kontakt s vodou a interagovat navzájem či s jinými hydrofobními molekulami, zatímco zbytek molekuly vykazuje hydrofilní vlastnosti a upřednostňuje kontakt s vodou. Fosfolipidy slouží jako základní stavební kameny biologických membrán. Nejhojněji se vyskytujícím fosfolipidem v buněčných membránách je fosfatidylcholin (lecitin), který obsahuje malou molekulu cholinu připojenou k fosfátu a k jeho hydrofilní části. Tento fosfolipid představuje velkou část zásob cholinu v těle. Lecitin jako významný představitel povrchově aktivních látek nachází již od starověku široké uplatnění. Každodenně se využívá v řadě oblastí zahrnujících potravinářský, živočišný, kosmetický, farmaceutický a výrobní průmysl. Největší použití nachází lecitin v potravinářství, kde slouží jako emulgátor. Dále se uplatňuje především v kosmetice, kde se využívají jeho zjemňující účinky a působení proti akné. Fosfatidylcholin je také známý tím, že napomáhá prostoupení různých kosmetických látek (vitamínů, provitaminů, látek ovlivňujících regenerační schopnost epidermis) do vnější vrstvy pokožky. Zástupci hydrogenovaného fosfatidylcholinu jsou mimo jiné semisystetické sloučeniny jako je například právě dipalmitoylfosfatidylcholin (DPPC). Tento fosfolipid se využívá pro jeho schopnost stabilizovat kožní bariéru a tak chránit pokožku před nepříznivými vlivy okolí.



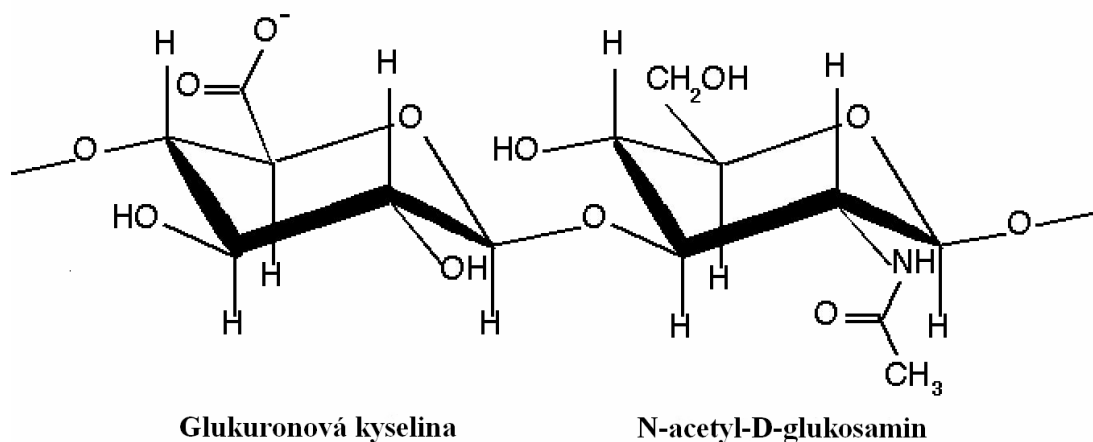
## 2. TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Kyselina hyaluronová

V roce 1934 popsal Karl Meyer a jeho asistent, John Palmer, postup izolace nového glykosaminoglykanu z hovězího sklivce. Objevili, že tato látka obsahuje uronovou kyselinu a aminocukr, ale ne sufloester, který je pro glykosaminoglykany specifický. Látku nazvali hyaluronová kyselina (angl. *hyaluronic acid*, HA) jako spojení slov *hyaloid* (sklovitý) a *uronic acid* (uronová kyselina). Ve fyziologickém pH dochází k disociaci karboxylových skupin, a proto by měla být nazývána hyaluronát. Dnes je tato makromolekula stále častěji označována jako **hyaluronan** za účelem zdůraznění její polysacharidové podstaty. [1, 2]

#### 2.1.1 Chemická struktura HA

Hyaluronan se skládá ze základních disacharidových jednotek tvořených D-glukuronovou kyselinou a *N*-acetyl-D-glukosaminem vzájemně spojených střídající se  $\beta$ -1,3 a  $\beta$ -1,4 glykosidickou vazbou (**Obr. 1**). Oba sacharidy prostorově vycházejí z glukosy, která v beta konfiguraci dovoluje všem objemným skupinám (hydroxylové, karboxylové, acetamidové) být ve stericky příznivé ekvatoriální pozici, zatímco všechny malé atomy vodíku zaujímají méně stericky příznivé axiální polohy. Z toho důvodu je struktura disacharidu energeticky velmi stabilní. [1, 3, 4, 5, 6]



**Obr. 1:** Struktura HA. Základ tvoří opakující se disacharidové jednotky glukuronové kyseliny a *N*-acetylglukosaminu. [1]

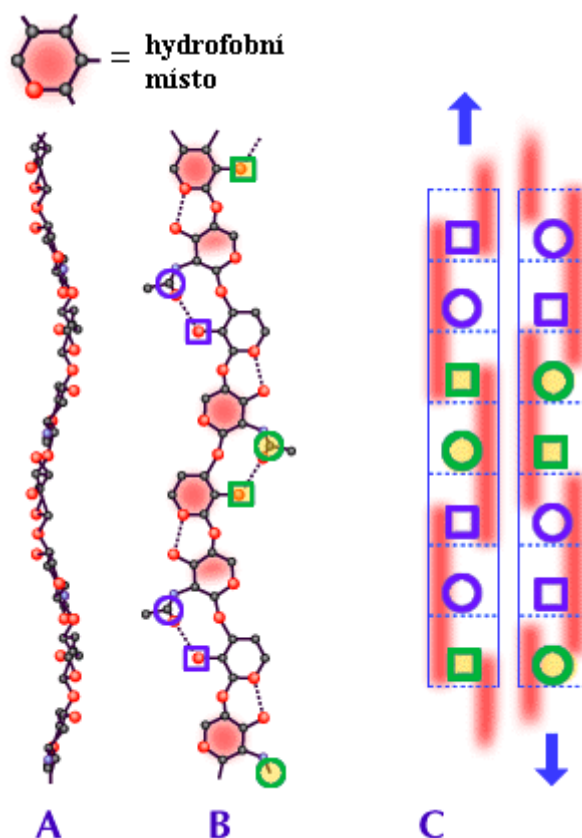
#### 2.1.2 Struktura polymeru

Enzymy hyaluronansyntázy syntetizují velké lineární polymery, ve kterých se opakuje motiv disacharidové jednotky. Tato jednotka vzniká střídavým připojováním glukuronové kyseliny a *N*-acetylglukosaminu k rostoucímu řetězci. Aktivované nukleotidové cukry (UDP-glukuronová kyselina a UDP-*N*-acetylglukosamin) slouží kyselině glukuronové a *N*-acetylglukosaminu jako substráty. Počet opakujících se disacharidů může v kompletní molekule dosáhnout 10 000 a více, při molekulové hmotnosti jedné disacharidové jednotky 400 Da může celková molekulová hmotnost řetězce dosahovat až 4 miliony Da. Průměrná

délka disacharidu je  $\sim 1$  nm a tak molekula hyaluronanu s 10 000 jednotkami v nataženém stavu dosahuje velikosti 10  $\mu\text{m}$ . Tato délka je přibližně shodná s průměrem lidského erytrocytu. [3, 5, 6]

### 2.1.3 Struktura hyaluronanu v roztoku

Při pH 7 jsou karboxylové skupiny převážně ionizovány a molekula hyaluronanu se stává polyaniontem s příslušným vyměnitelným kationem k udržení nábojové neutrality. Molekuly hyaluronanu mohou ve vodě vzájemně agregovat a to hlavně pomocí vazeb mezi hydrofobními místy. Hydrofobní místa, tzv. „hydrophobic patch“, vznikají jako důsledek axiální orientace vodíků. Sekundární stuhovitá struktura má výjimečné vlastnosti. Obě strany stuhy jsou identické, ale antiparalelní, a co je možné na jedné straně stuhy, je také možné na druhé straně (**Obr. 2**). Agregáty mohou růst z obou stran stuhy. Specifické interakce umožňují hromadění agregátů ve vodě a dochází k vytvoření síťoviny – terciární struktury. [1, 5]



**Obr. 2:** Různé pohledy na strukturu hyaluronanu; A a B - počítačové projekce molekuly hyaluronanu, C – schéma interakce dvou molekul hyaluronanu. [6]

Ve fyziologickém roztoku je hlavní řetězec molekuly hyaluronanu „vyztužen“ kombinací chemické struktury disacharidu, vnitřních vodíkových můstků a interakcemi s rozpouštědlem. Axiální atomy vodíku tvoří nepolární, relativně hydrofobní oblast, zatímco ekvatoriální postranní řetězce tvoří více polární, hydrofilní oblast, čímž vytvářejí stočenou stuhovitou strukturu. Molekula hyaluronanu má ve fyziologickém roztoku strukturu nahodilého klubka, takže zaujímá velmi rozsáhlou oblast.

Doménová struktura hyaluronanu má zajímavý a důležitý význam. Malé molekuly jako voda, elektrolyty a živiny mohou volně difundovat rozpouštědlem do domény. Nicméně velké molekuly jako proteiny budou z domény částečně vyloučeny kvůli jejich hydrodynamické velikosti. Čím budou molekuly větší, tím méně prostoru pro ně v doméně hyaluronanu bude, což vede k pomalejší difúzi makromolekul přes síť hyaluronanu a k jejich nižší koncentraci uvnitř sítě oproti okolnímu prostředí bez hyaluronanu. Zajímavé je, že řetězce hyaluronanu se v roztoku neustále pohybují a efektivní póry v síti průběžně mění velikost. V podstatě tedy mohou všechny molekuly procházet hyaluronovou sítí, ale s rozdílným stupněm retardace závislejím na jejich hydrodynamickém objemu. [5, 6]

#### 2.1.4 Výskyt a průmyslová výroba hyaluronanu

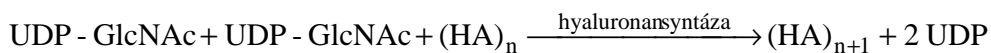
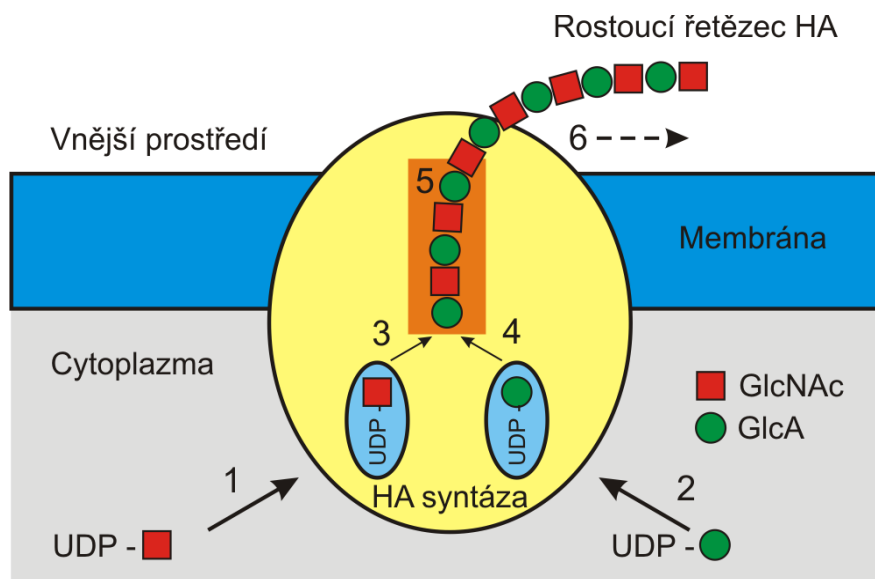
Hyaluronan je přítomen u všech obratlovců a také v pouzdrech některých patogenních bakterií jako je *Streptococcus equisimilis*, *Streptococcus zooepidemicus* a *Pasteurella*. HA je součástí extracelulárních matrix (ECM) mnoha tkání a v některých tkáních představuje jejich hlavní složku. Koncentrace hyaluronanu je vysoká zejména v kohoutím hřebínku ( $7,5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ), v synoviální tekutině ( $3\text{--}4 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ), v pupeční šňůře ( $3 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ), v očním sklivci ( $0,1\text{--}0,4 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ). [1, 3, 5]

V ostatních tkáních obsahujících méně hyaluronanu slouží jako esenciální strukturní složka matrix. Největší množství hyaluronanu v lidském těle, konkrétně 7-8 g v průměru u dospělého člověka, což je ~ 50 % celkového množství v těle, se nachází v kožní tkáni. HA je přítomna jak v dermis ( $0,2\text{--}0,5 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ), tak v epidermis ( $0,1 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ ). [1, 5]

Dříve se hyaluronan průmyslově vyráběl z kohoutích hřebínků. Dnes se od této produkce upouští a k výrobě kyseliny hyaluronové se využívají především mikroorganismy – již zmíněné bakterie (např. *Streptococcus equisimilis*).

#### 2.1.5 Biosyntéza hyaluronanu

Syntéza hyaluronanu v savčích buňkách se liší od syntézy ostatních polysacharidů v mnoha ohledech. Molekula je prodlužována na redukujícím konci střídavým přenosem UDP-hyaluronanu k substrátům UDP-GlcNac a UDP-GlcA, za současného uvolnění UDP. Ostatní glykosaminoglykany rostou na neredukujícím konci (**Obr. 3**). Samotná syntéza hyaluronanu je zprostředkována enzymy zvanými hyaluronansyntázou. Jsou známy tři savčí syntázy označované jako HAS1, HAS2 a HAS3.



- |                                      |                                    |
|--------------------------------------|------------------------------------|
| 1. UDP-GlcNAc                        | 4. $\beta$ -(1,4)-GlcA transferasa |
| 2. UDP-GlcA                          | 5. HA (akceptor)                   |
| 3. $\beta$ -(1,4)-GlcNAc transferasa | 6. HA přenos (translokace)         |

**Obr. 3:** Model syntézy HA [7]

Většina glykosaminoglykanů je vytvářena v Golgiho aparátu. Naproti tomu hyaluronan je syntetizován v plazmatické membráně, vznikající řetězce jsou vytlačovány přímo do extracelulární matrix. Tento mechanismus syntézy funguje pro syntézu hyaluronanu u obratlovců a u grampozitivních streptokoků. Nicméně se zdá, že existuje rozdílný mechanismus syntézy hyaluronanu u gramnegativní *Pasteurelly*, u které jsou řetězce prodlužovány na neredukujícím konci. [1, 2, 8]

## 2.1.6 Biotransformace

Samotná biotransformace hyaluronanu probíhá různými způsoby na různých místech. Nejčastějším místem biodegradace HA jsou játra, a to zejména při parenterálních způsobech podání. Topické podání naopak vykazuje degradaci již v pokožce. [9]

### 2.1.6.1 Obrat

Obrat (angl. *turnover*) HA v savcích tkáních je značný, u dospělého člověka činí kolem 5 g hyaluronanu za den. Hlavní zdroje hyaluronanu jsou klouby, kůže, oči a střevo. Ve sklivci je poločas rozpadu 70 dní, v kůži a kloubech okolo 12 hodin, zatímco v přední komoře oční 1-1,5 hod a v krevním řečišti 2-5 minut. [1, 10]

V epidermis (topické podání) je obrat HA rychlý. Keratinocyty v monokultuře si ponechávají část HA jako součást buněčné vrstvy, část na povrchu plazmatické membrány a část v intracelulárním kompartmentu.

V synoviální tekutině je obrat HA závislý na velikosti molekuly. Zatímco velké molekuly setrvávají v synoviální štěrbině, malé molekuly jsou odsouvány a degradovány. [9]

### **2.1.6.2 Katabolismus**

Katabolismus hyaluronanu zahrnuje degradaci jeho polysacharidového řetězce na monomery, které jsou využívány jinými tkáněmi. Hyaluronan je odváděn tkáňovým mokem a dostává se do krevního oběhu, odkud je vychytáván převážně parenchymatickou frakcí jaterních buněk. Endoteliální buňky degradují HA až na nízkomolekulární produkty. Vychytávání a degradace hyaluronanu jsou způsobeny schopností buněk vázat HA pomocí receptorů několika typů. Jsou to transmembránové receptory (CD44, RHAMM) a některé další (LYVE, ICAM, VCAM...). [1, 2, 8, 9]

Schopnost jaterních endoteliálních buněk endocytovat (pohlcovat) HA není čistě specifická pro HA vzhledem k tomu, že o stejný mechanismus soutěží také chondroitin a heparin. [1, 8]

Degradace hyaluronanu následně probíhá v lysosomech a je zprostředkována enzymaticky. Na tomto ději se podílejí jak enzymy specifické pro HA – hyaluronidasy, kterých je několik podtypů, tak enzymy podílející se i na jiných dějích – glukuronidasy, glykosidasy a některé další. [1, 2, 8, 9]

Degradční produkty tvořené po úplné degradaci se při analýze chovají jako laktáty a acetáty. Metabolismus HA je tedy v souladu s metabolismem acetylových skupin přes acetyl-CoA.

Exkrece hyaluronanu je převážně extrarenální a je limitována molekulovou hmotností molekuly. [9]

### **2.1.7 Využití kyseliny hyaluronové**

Ačkoliv má hyaluronan velmi jednoduchou strukturu, téměř vše ostatní týkající se této molekuly je neobvyklé. Někdy je její role mechanická a strukturní (v synoviální tekutině, ve sklivci nebo v pupeční šňůře), zatímco někdy ovlivňuje v malých koncentracích spouštění důležitých reakcí v buňce.

Jako takzvaný „inertní“ biomateriál hraje hyaluronová kyselina významnou roli ve vodní homeostázi tkání, regulaci permeability jiných látek, lubrikaci kloubů. Jako „aktivní“ glykosaminoglykan se hyaluronová kyselina specificky váže na proteiny v ECM a na povrchu buněk. Interakce protein-ligand jsou důležité pro stabilizaci chrupavkové matrix, v buněčné pohyblivosti, v buněčné proliferaci, v morfogenezi a embryonálním vývoji, při rakovině a při zánětech.

Díky rozsáhlému množství fyziologických funkcí a vlastností našla HA řadu uplatnění v medicíně a kosmetice. V klinické medicíně se hyaluronová kyselina používá jako

diagnostický ukazatel/marker mnoha nemocí včetně rakoviny, revmatické artritidy a patologie jater, jakož i doplnění poškozené synoviální tekutiny prostřednictvím intraartikulární injekce u artritických pacientů (léčba osteoartritidy). Je také využívána během oftalmologických a otologických operací, k regeneraci a rekonstrukci měkkých tkání, hojení ran, jako nosič léků, v kosmetice jako hydratační látka.

Využití hyaluronové kyseliny se jeví velmi nadějně v rozvoji tkáňového inženýrství a biomateriálů pro různé biomedicínské potřeby zahrnující ortopedické, kardiovaskulární, farmakologické a onkologické aplikace.

U chorob, jako je zmíněná revmatoidní artritida, může její širší nasazení vést ke snížení celkových nežádoucích účinků a zlepšení kvality života pacienta. Stejně tak může hrát velkou roli při terapii nevyléčitelných onemocnění, jako jsou určité formy rakoviny, kde je již vliv její funkce zkoumán.

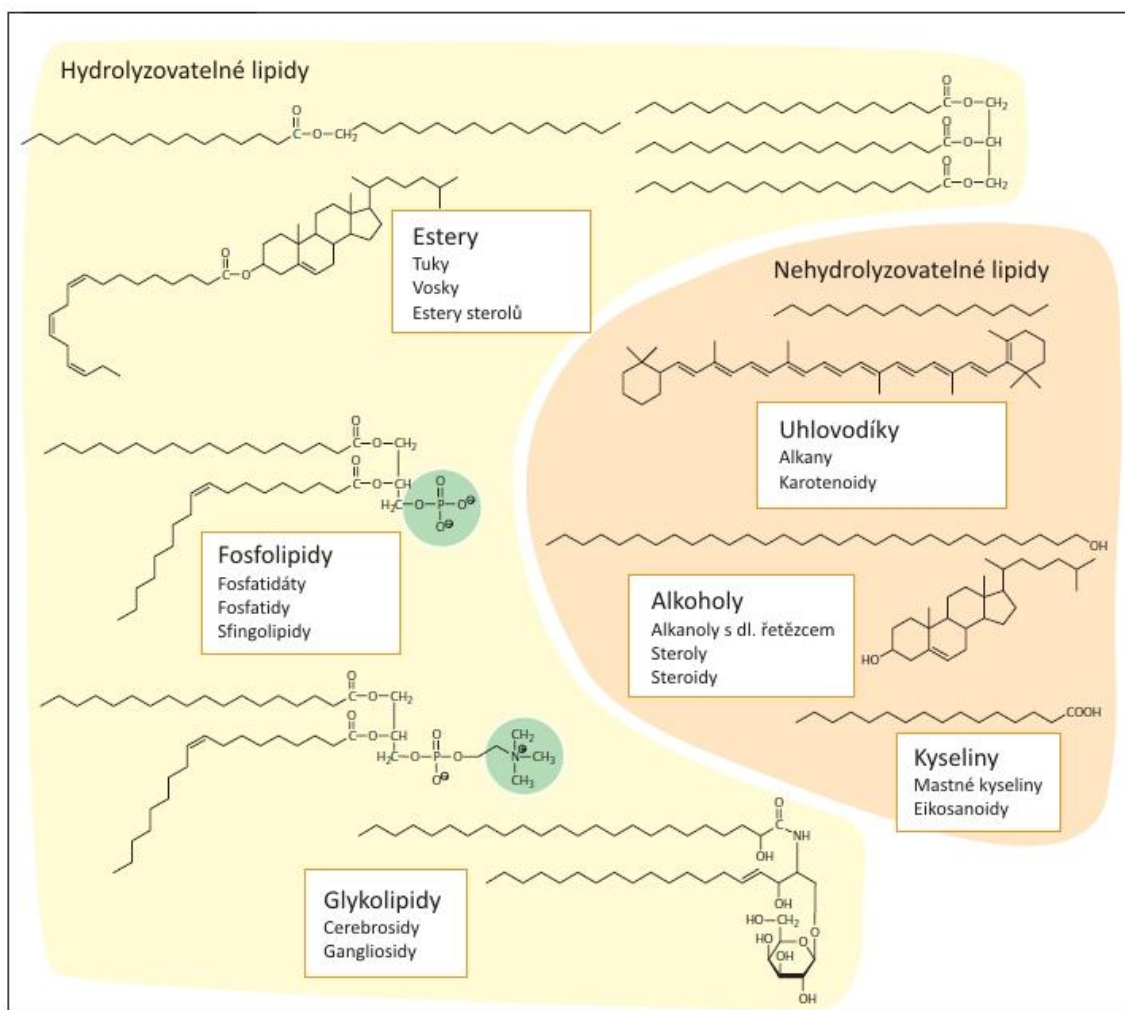
Dále jsou studovány možnosti jejího využití jakožto farmaceutického poloproduktu pro tvorbu nových derivátů s vlastnostmi nosičů terapeutických látek.

## **2.2 Lipidy**

Lipidy jsou velkou a různorodou skupinou látek biologického původu, které se snadno rozpouští v organických rozpouštědlech jako metanol, aceton, chloroform a benzen. Avšak na druhé straně jsou buď úplně nebo částečně nerozpustné ve vodě. Jejich nízká rozpustnost ve vodě je způsobena nedostatkem polarizujících atomů (O, N, S, a P). [11]

### **2.2.1 Základní rozdělení lipidů**

Lipidy mohou být rozděleny na látky hydrolyzovatelné (podléhající hydrolytickému štěpení) a nehydrolyzovatelné. (**Obr. 4**)



**Obr. 4:** Základní rozdělení lipidů [11]

### 2.2.1.1 Hydrolyzovatelné lipidy

Mezi hydrolyzovatelné lipidy patří jednoduché estery, fosfolipidy a glykolipidy.

- **Jednoduché estery** zahrnují tuky (triacylglycerol; jeden glycerol + tři acylové zbytky), vosky (jeden mastný alkohol + jeden acylový zbytek) a estery sterolu (jeden sterol + jeden acylový zbytek).
- **Fosfolipidy** jsou estery se složitějšími strukturami. Jejich charakteristickou složkou je fosfátový zbytek. Fosfolipidy obsahují fosfatidovou kyselinu (jeden glycerol + dva acylové zbytky + jeden fosfát) a fosfatidy (jeden glycerol + dva acylové zbytky + jeden fosfát + jeden amino alkohol). Je-li glycerol a jeden acylový zbytek nahrazen sfingosinem, jedná se potom o sfingolipidy.
- **Glykolipidy** se skládají z sfingosinu, mastné kyseliny a cukru. Tuto skupinu reprezentují cerebrosidy (jeden sfingosin + jedna mastná kyselina + jeden cukr) a gangliosidy (jeden sfingosin + jedna mastná kyselina + několik různých cukrů).

Jednotlivé složky hydrolyzovatelných lipidů jsou navzájem spojeny esterovými vazbami. Tyto vazby mohou být jednoduše narušeny buď enzymaticky či chemicky. [11]

### 2.2.1.2 Nehydrolyzovatelné lipidy

Do této skupiny se řadí uhlovodíky, alkoholy a kyseliny. **Uhlovodíky** zahrnují alkany a karotenoidy. K nehydrolyzovatelným **alkoholům** patří alkanoly s dlouhým řetězcem, cyklické steroly (cholesterol) a steroidy (estradiol, testosteron). Nejdůležitějšími **kyselinami** mezi lipidy jsou mastné kyseliny. K těmto kyselinám náleží i eikosanoidy – deriváty polynenasycené arachidonové kyseliny. [11]

### 2.2.2 Biologické funkce lipidů

Lipidy jsou důležitým zdrojem energie a představují hlavní energetickou rezervu živočichů. Specializované buňky zvané adipocyty skladují především neutrální tuky. V případě potřeby jsou mastné kyseliny z adipocytů uvolněny a následně oxidovány v mitochondriích za tvorby vody a CO<sub>2</sub>. Tento proces vede ke vzniku redukováných koenzymů, které jsou použity pro produkci ATP v dýchacím řetězci.

Amfipatické lipidy jsou používány buňkami ke stavbě membrán. Typické membránové lipidy zahrnují fosfolipidy, glykolipidy a cholesterol. Tyto lipidy jsou podrobněji rozebrány v následující kapitole. Tuky jsou pouze slabě amfifilní a proto nejsou vhodnými složkami membrán.

Dále jsou lipidy výbornými izolanty. U vyšších organismů se neutrální tuky nacházejí v podkožní tkáni a v okolí některých orgánů, kde slouží jako mechanické a termální izolanty. Lipidy, jako základní složky buněčných membrán, mechanicky a elektricky izolují buňky před jejich prostředím. Nepropustnost lipidových membrán vůči iontům umožňuje vytvoření membránového potenciálu.

Některé lipidy převzaly v těle různé specifické role. Steroidy, eikonasoidy a některé metabolity fosfolipidů mají signální funkce. Dále slouží jako hormony, mediátory a druzí poslové. Ostatní lipidy vytvářejí tzv. „kotvu“ umožňující přichycení proteinů k membráně. Lipidy také produkují kofaktory enzymatických reakcí – vitamin K a ubiquinon. Karotenoid retinal (lipid citlivý na světlo) je klíčovou molekulou v procesu vidění.

Lidské tělo není schopno vytvářet některé lipidy. Mezi tyto látky se řadí esenciální mastné kyseliny a vitaminy rozpustné v tucích, jež musí být přijímány potravou. [11, 12, 13]

### 2.2.3 Mastné kyseliny a tuky

Mastné kyseliny je společný název pro alifatické monokarboxylové kyseliny s uhlovodíkovým řetězcem o počtu 4 až 26 atomů uhlíku. Vyskytují se ve všech organismech jako složky tuků a membránových lipidů. V těchto sloučeninách jsou mastné kyseliny esterifikovány alkoholy (glycerol, sfingosin, cholesterol). Nicméně se mastné kyseliny nacházejí v malém množství i v neesterifikované formě. V tomto případě se nazývají volné



masné kyseliny. Tyto volné masné kyseliny mají výrazné amfipatické vlastnosti a běžně vytvářejí vazby s proteiny. Nejběžnějšími masnými kyselinami u vyšších rostlin a živočichů jsou kyselina palmitová s 16 uhlíky a kyselina stearová s 18 uhlíky. Přirozeně se vyskytují masné kyseliny s nerozvětveným uhlovodíkovým řetězcem a se sudým počtem atomů uhlíku, což je způsobeno jejich biosyntézou v organismu z dvouuhlíkatých jednotek (acetylkoenzym A). Rozvětvené masné kyseliny jsou přítomny pouze u bakterií.

Masné kyseliny mohou být rozděleny podle přítomnosti dvojných vazeb na nasycené (bez dvojných vazeb) a nenasycené (obsahující jednu či více dvojných vazeb). Obvyklé nenasycené masné kyseliny zahrnují kyselinu olejovou a linolovou. Ze dvou možných isomerů (cis-trans) se v přírodních lipidech nacházejí jen cis formy. Pro přesnou charakterizaci struktury masných kyselin se využívá tzv. zkrácený zápis N:M, kde N je počet uhlíků a M je počet dvojných vazeb. Zápis 18:0 označuje C18 masnou kyselinu, která neobsahuje žádnou dvojnou vazbu, zatímco 18:2 znamená přítomnost dvou dvojných vazeb. Atomy uhlíků masných kyselin jsou číslovány od karboxylového konce. Druhý a třetí atom uhlíku jsou též označovány jako  $\alpha$ -uhlík a  $\beta$ -uhlík. Metylový uhlík na konci řetězce se nazývá  $\omega$ -uhlík či n-uhlík. Pozice dvojná vazba je znázorněna symbolem  $\Delta$  doplněným o číslo v horním indexu. Například cis- $\Delta^9$  vyjadřuje výskyt cis dvojná vazby mezi 9 a 10 atomem uhlíku. Další možností určení pozice dvojná vazby je N:M;a,b,c (a,b,c jsou čísla uhlíků z nichž vychází dvojná vazba, počítáno od karboxylového konce). Pozice dvojná vazby může být také udána její vzdáleností od  $\omega$  či n metylového uhlíku.

Esenciální masné kyseliny si lidský organismus nedokáže sám syntetizovat a proto je musí přijímat v potravě. Všechny polynenasycené masné kyseliny jsou esenciální. Patří mezi ně kyselina linolová, linolenová a arachidonová. I když umí organismus prodlužovat masné kyseliny přidáváním  $C_2$  jednotek, není schopen zavést dvojná vazby do řetězce masné kyseliny dále než po C-9 a z toho vyplývá nutnost dodávat esenciální masné kyseliny potravou. Linolová a linolenová kyselina mohou být přeměny v procesu elongace na arachidonovou kyselinu (tedy mohou nahradit arachidonou kyselinu v potravě).

Tuky jsou estery vyšších masných kyselin a glycerolu. Esterifikací jedné masné kyseliny a glycerolu vzniká monoacylglycerol (zbytek masné kyseliny = acylový zbytek). Esterifikace dalšími masnými kyselinami vede k tvorbě diacylglycerolu a nakonec triacylglycerolu, skutečnému tuku. Triacylglyceroly se též nazývají neutrální tuky, jelikož nemají žádný náboj.

Tři acylové zbytky v molekule tuku se mohou lišit délkou řetězce a počtem dvojných vazeb. To vede k velkému množství možných kombinací jednotlivých molekul tuku. Tuky extrahované z biologických materiálů představují směs velmi podobných sloučenin, které se liší ve zbytcích masných kyselin. K jednoznačnému očíslování uhlíků glycerolu se používá tzv. -sn- systém (sn = Stereochemical numbering, stereochemické číslování). Chirální centrum může vzniknout v molekule triacylglycerolu na prostředním atomu uhlíku (C-2) v případě, že na C-1 a na C-3 jsou navázané rozdílné masné kyseliny.

Vlastnosti masných kyselin a z nich odvozených tuků jsou značně ovlivněny délkou jejich řetězce a počtem dvojných vazeb. Čím kratší řetězec a větší počet dvojných vazeb masné kyseliny obsahují, tím nižší je jejich teplota tání. [11, 12, 13]

## 2.2.4 Membránové lipidy

Jak již bylo zmíněno, plní lipidy v organismu různé biologické funkce. Lipidy jsou rezervou a bohatým zdrojem energie, vykonávají v organismech ochrannou funkci a v neposlední řadě slouží jako stavební kameny biologických membrán. K hlavním třem druhům membránových lipidů patří fosfolipidy, glykolipidy a cholesterol.

### 2.2.4.1 Fosfolipidy

Fosfolipidy jsou přítomny ve všech biologických membránách v hojném počtu. Molekulu fosfolipidu tvoří čtyři komponenty: mastné kyseliny, základna k níž jsou mastné kyseliny připojeny, fosfát a alkohol navázaný na fosfát (**Obr. 5**). Mastné kyseliny ve struktuře fosfolipidu poskytují hydrofobní bariéru, zatímco zbytek molekuly vykazuje hydrofilní vlastnosti umožňující interakce s prostředím.

Základem fosfolipidů může být glycerol (tříuhlíkatý alkohol) nebo sfingosin (složitější alkohol). Fosfolipidy odvozené od glycerolu se nazývají fosfoglyceridy. Fosfoglyceridy se skládají z glycerolu a k němu navázaných dvou mastných kyselin a fosforylovaného alkoholu.

U fosfoglyceridů jsou hydroxylové skupiny glycerolu na C-1 a C-2 esterifikovány karboxylovými skupinami pocházejícími ze dvou mastných kyselin. Hydroxylová skupina na C-3 je esterifikována kyselinou fosforečnou. Nejjednodušším fosfoglyceridem jsou fosfatidáty (aniony kyseliny fosfatidové, nebo-li diacylglycerol 3-fosfát). Fosfatidátů se v membránách vyskytuje pouze velmi malé množství. Avšak fosfatidáty jsou významnými intermediáty v biosyntéze ostatních fosfoglyceridů.

Většina fosfoglyceridů je odvozena od fosfatidátů a to vytvořením esterové vazby mezi fosfátovou skupinou fosfatidátu a hydroxylovou skupinou jednoho z alkoholů. Těmito alkoholy mohou být aminokyselina serin, etanolamin, cholin, glycerol a inositol. [11, 12]

Fosfatidylcholin (lecitin) je nejhojněji se vyskytující fosfolipid v buněčných membránách a představuje velkou část zásob cholinu v těle (**Obr. 5**). Cholin je důležitý pro přenos nervového vzruchu a také jako zásoba labilních metylenových skupin. Dipalmitoyllecitin je povrchově velmi účinné agens, které zabraňuje adhezenci vnitřních povrchů plic způsobené povrchovým napětím. Jeho nedostatek v plicích vyvolává dechové selhání (Respiratory Distress Syndrom, RDS). Fosfatidyletanolamin (kefalin) se liší od fosfatidylcholinu pouze tím, že místo cholinu má navázaný etanolamin. Fosfatidylserin obsahuje místo etanolaminu aminokyselinu serin a je přítomen ve většině tkání. Fosfatidylglycerol dává vzniknout kardiolipidům, které jsou hlavními lipidy v mitochondriálních membránách. U fosfatidylinostolu je přítomen jako stereoisomer myoinositol. Fosfatidylinositol-4,5-bis-fosfát je specifickou složkou buněčné membrány a je enzymaticky štěpen na diacylglycerol a inositoltrifosfát, které působí jako druzí poslové.

Lysofosfolipidy jsou fosfoacylglyceroly, které obsahují pouze jeden acyl. Příkladem je lysolecitin, který je důležitým metabolitem při přeměně fosfolipidů.

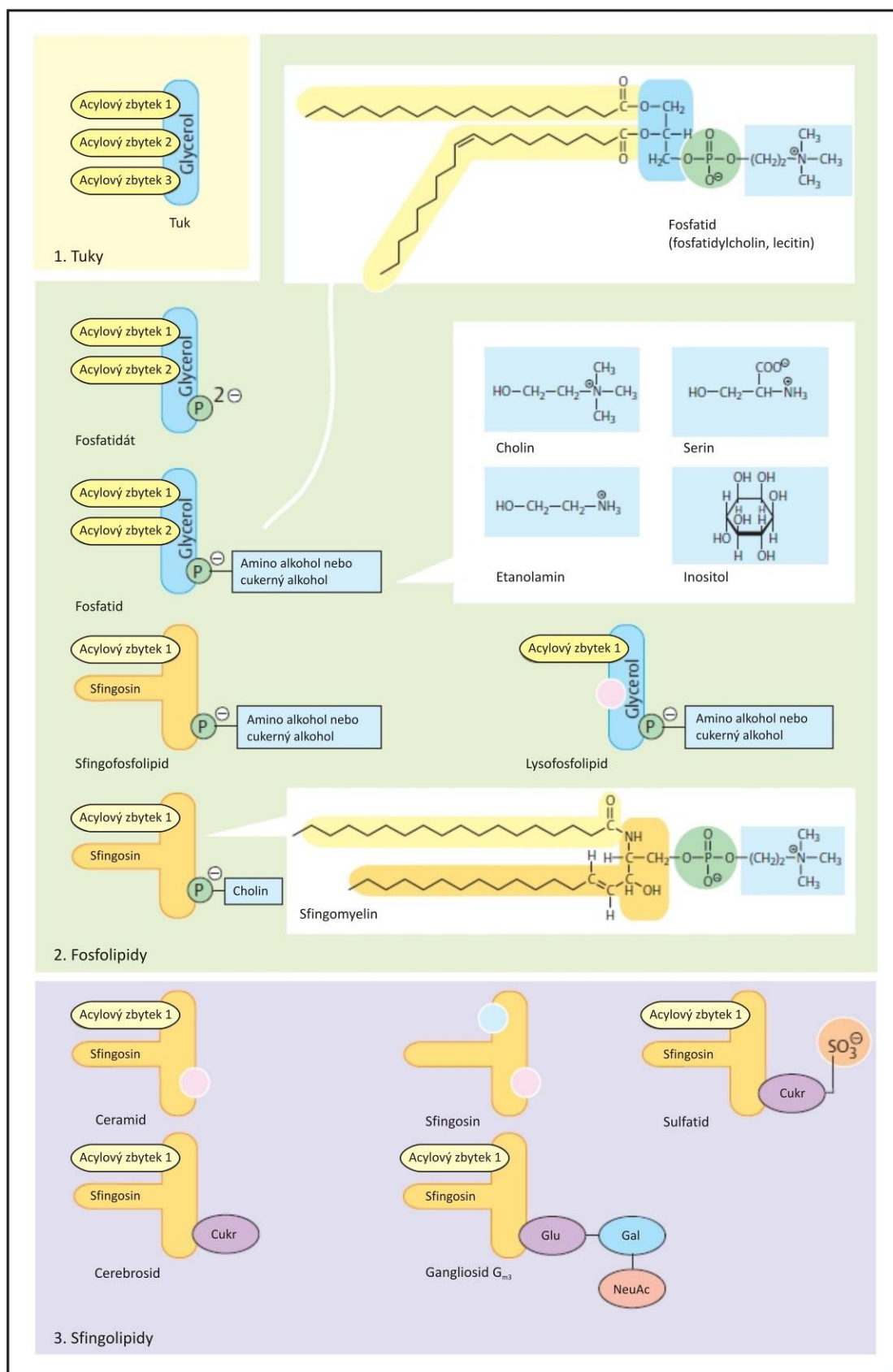
Sfingolipidy se nacházejí ve velkém množství v membránách nervových buněk přítomných v mozku a nervové tkáni. Tyto lipidy mají ve své struktuře nahrazen glycerol a jeden acylový zbytek aminoalkoholem s nenasyceným řetězcem. Tímto aminoalkoholem je sfingosin. Kombinace sfingosinu s mastnou kyselinou se nazývá ceramid a sfingosin je spojen s mastnou kyselinou amidovou vazbou. Nejdůležitějším sfingolipidem je sfingomyelin. Sfingomyelin obsahuje sfingosin na jehož aminoskupinu je navázána mastná kyselina a dále je primární hydroxylová skupina sfingosinu esterifikována fosforylcholinem.

Některé fosfolipidy nesou kromě negativního náboje z fosfátového zbytku i další náboje. U fosfatidylcholinu a fosfatidyletanolaminu vykazuje atom dusíku aminoalkoholu pozitivní náboj. Jako celek se tedy tyto dva fosfatidy jeví jako neutrální. Naproti tomu fosfatidylserin, který kromě záporného náboje na fosfátu obsahuje ještě další kladný a záporný náboj pocházející ze zbytku serinu a fosfatidylinositol (bez žádného dalšího náboje) mají celkový náboj negativní. [11, 13]

#### **2.2.4.2 Glykolipidy**

Glykolipidy jsou velmi rozšířené ve všech tkáních, zvláště pak v nervové tkáni, jako například v mozku. Cukerné zbytky glykolipidů jsou vždy orientovány na extracelulární straně membrány. Jak již název naznačuje, obsahují ve své molekule cukr. Podobně jako sfingomyelin jsou glykolipidy živočišných buněk odvozeny od sfingosinu. Jako u sfingomyelinu je aminoskupina sfingosinu acylována mastnou kyselinou. Oproti sfingomyelinu se však glykolipidy liší ve složce navázané k primární hydroxylové skupině sfingosinu, jelikož u glykolipidů je k této skupině připojen jeden či více cukrů (**Obr. 5**). Nejjednodušší glykolipid zvaný cerebrosid obsahuje jeden cukerný zbytek a to buď glukosu nebo galaktosu.

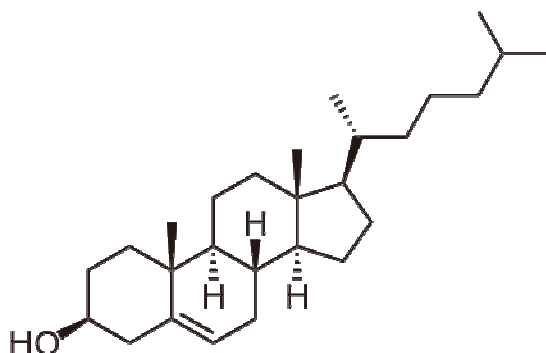
Složitější glykolipidy, takzvané gangliosidy, mají rozvětvený řetězec tvořený až ze sedmi cukerných zbytků. Gangliosidy jsou také přítomny ve velkém množství v nervové tkáni. Kromě receptorových funkcí mají ještě řadu dalších funkcí, ale ty doposud nebyly plně objasněny. [11, 12, 13]



**Obr. 5: Struktura tuků, fosfolipidů a glykolipidů [11]**

### 2.2.4.3 Cholesterol

Cholesterol, lipid, jehož struktura je zcela odlišná od fosfolipidů. Cholesterol je steroid, jehož základní strukturu tvoří cyklopentanoperhydrofenantren. Na jednom konci steroidu je navázán uhlovodíkový řetězec a na druhém konci je navázána hydroxylová skupina (**Obr. 6**). Cholesterol slouží jako prekurzor velkého počtu stejně významných steroidů, mezi které patří žlučové kyseliny, nadledvinové a pohlavní hormony, vitaminy D a mnoho dalších. Cholesterol je široce rozšířen ve všech buňkách těla, především v nervové tkáni. Je významnou složkou plasmatické membrány a lipoproteinů krevní plasmy, a to jak volný, tak ve formě esterů s vyššími mastnými kyselinami. Cholesterol není přítomen u prokaryot, ale ve skutečnosti se nachází v proměnlivém množství ve všech živočišných membránách. [12, 13]



**Obr. 6 : Cholesterol** [12]

### 2.2.5 Amfifilní membránové lipidy

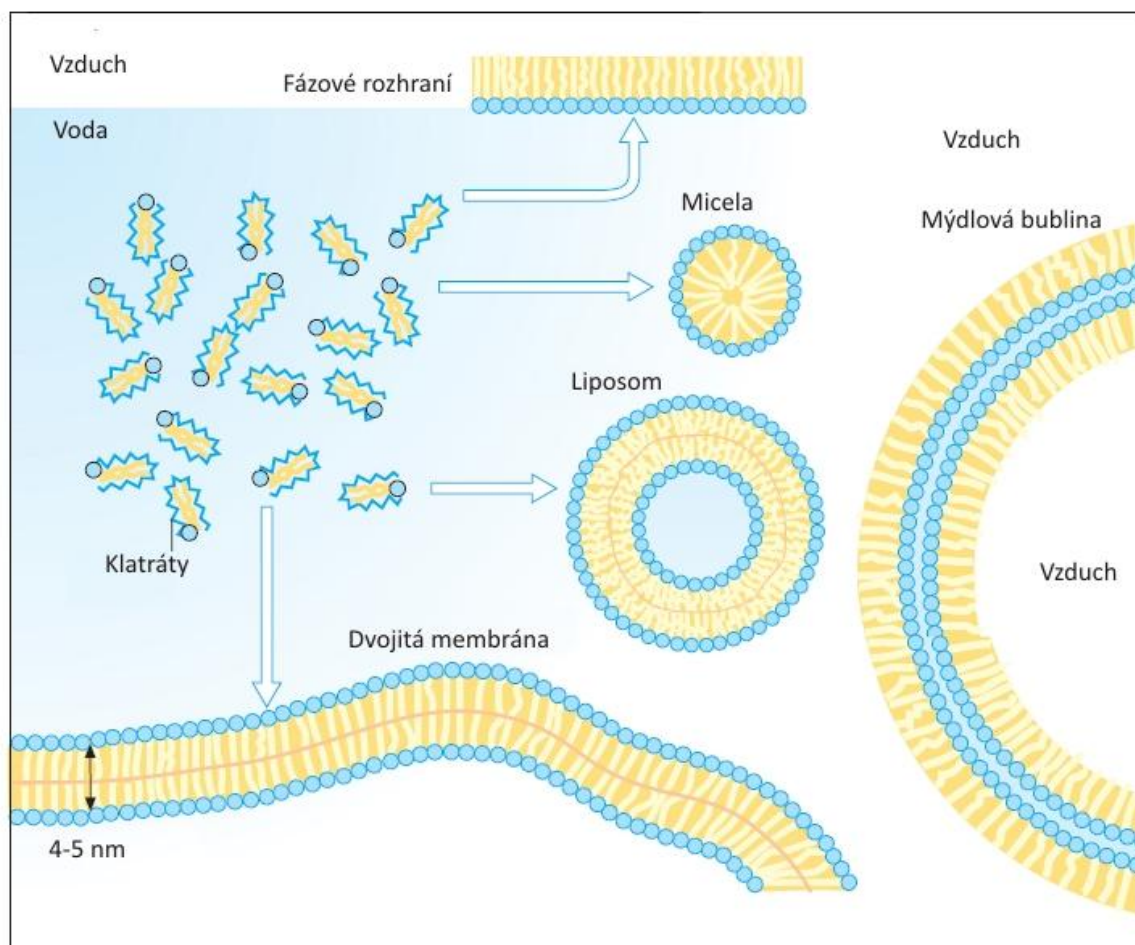
Lipidy buněčných membrán vykazují v každé své molekule dvě zcela odlišné vlastnosti. Obsahují totiž jak hydrofilní (ve vodě rozpustnou) tak hydrofobní (ve vodě nerozpustnou) část. Takové molekuly se nazývají amfipatické.

Amfipatické molekuly jsou tedy objekty, v nichž se střetávají dvě protikladné síly: hydrofilní části upřednostňují kontakt s vodou, zatímco hydrofobní konce se snaží minimalizovat kontakt s vodou a interagovat navzájem či s jinými hydrofobními molekulami.

Uspořádání takovýchto molekul ve vodném prostředí může být různé. Jedním z možných uspořádání je tvorba micel, kulovitých struktur v nichž jsou polární části obklopeny vodou a navzájem interagující uhlovodíkové řetězce uzavřeny uvnitř micely. Nebo mohou hydrofilní a hydrofobní části membránových lipidů vytvořit lipidovou dvojvrstvu složenou ze dvou lipidových listů. Toto uspořádání je energeticky nejvýhodnější. Hydrofilní části jsou v obou listech tvořících dvojnou vrstvu obráceny směrem do vody, kdežto hydrofobní řetězce každého listu spolu vzájemně interagují a vytvářejí vnitřní hydrofobní prostor. (**Obr. 7**)

Fosfolipidy a glykolipidy ve vodném prostředí upřednostňují tvorbu dvojné vrstvy před tvorbou micely. Důvodem je velikost dvou řetězců mastných kyselin obsažených ve fosfolipidu či glykolipidu. Tyto řetězce jsou totiž příliš objemné na to, aby byly součástí micely. Oproti tomu soli mastných kyselin (př. palmitát sodný – složka mýdla) tvořené pouze

jedním řetězcem snadno tvoří micely. Rozměr micel je limitován a to maximálně do 20 nm v průměru. Tloušťka biologických membrán se pohybuje v rozmezí 4-9 nm. [12]



**Obr. 7:** Uspořádání amfifilních látek ve vodě [11]

Ve vodě dochází k samovolné a rychlé agregaci fosfolipidů za vzniku membrán. Hydrofobní interakce jsou hlavní hnací silou při formování lipidových dvojvrstev. Jakmile dojde k izolaci uhlovodíkových řetězců membránových lipidů v nepolárním prostoru dvojvrstvy, začnou se z tohoto prostoru uvolňovat molekuly vody. Kromě toho napomáhají van der Waalsovi přitažlivé síly mezi uhlovodíkovými řetězci k těsnému shromáždění řetězců. A v neposlední řadě jsou zde elektrostatické a vodíkové interakce mezi polární částí a molekulami vody. A tak jsou lipidové dvojvrstvy stabilizovány celou řadou sil, jež umožňují molekulární interakce v biologických systémech.

Hydrofobní interakce mají tři významné biologické následky. Prvním z nich je základní tendence tvořit rozsáhlé lipidové dvojvrstvy. Dále mají lipidové dvojvrstvy sklon se samovolně uzavírat a vytvářet tak uzavřené oddíly. Uzavřená struktura je stabilní, neboť v ní nedochází k energeticky nepříznivému vystavení hydrofobních uhlovodíkových řetězců vodnému prostředí. Posledním následkem je samozacelovací schopnost dvojných vrstev. Každá trhlinka vytvoří volné rozhraní s vodou, což je energeticky nevýhodné, a proto se molekuly dvojných vrstev samovolně přeuspořádají, aby toto volné rozhraní odstranily. [12, 13, 14]

Obecně jsou lipidové dvojvrstvy vysoce nepropustné pro ionty a většinu polárních molekul. Voda je výjimkou tohoto zobecnění. Jelikož má voda malou velikost a vysokou koncentraci může lehce procházet membránami. Přechod malých hydrofilních molekul lipidovou dvojvrstvou by mohl probíhat následovně: nejdříve se molekula zbaví vodného solvatačního obalu, poté se rozpustí v uhlovodíkovém jádru membrány a nakonec projde přes toto jádro na opačnou stranu membrány, kde je znovu resolvatována vodou. Avšak iont jako  $\text{Na}^+$  přechází membránami velmi pomalu, jelikož nahrazení jeho koordinujícího obalu složeného z polárních molekul vody za nepolární interakce s vnitřkem membrány je vysoce energeticky nepříznivé. [12]

### 2.2.5.1 Liposomy

Lipidové váčky, liposomy (**Obr. 7**), obsahují kompartment s vodou uzavřený lipidovou dvojvrstvou a jsou používány ke studiu propustnosti membrán či přenosu látek do buněk. Liposomy se připravují suspendováním vhodného lipidu (např. fosfatidylcholinu) ve vodném prostředí následovaného sonifikací za vzniku disperze tvořené uzavřenými váčky o stejné velikosti. Takto vzniklé váčky mají kulovitý tvar o průměru přibližně 50 nm. Větší váčky (v řádu 1  $\mu\text{m}$  v průměru) mohou být vytvořeny pomalým odpařením organického rozpouštědla ze suspenze fosfolipidu ze směsi rozpouštědel. Váčky v přítomnosti různých látek mohou do svých uzavřených vodných oddílů zachytit ionty či molekuly těchto látek. [12]

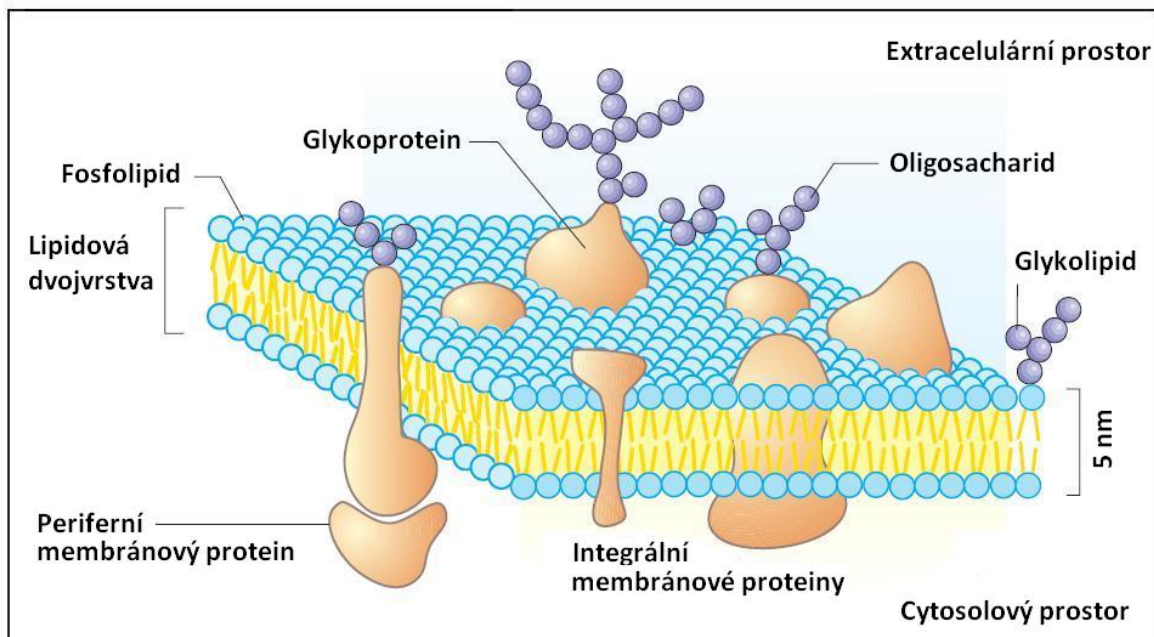
### 2.2.6 Membránové proteiny

Hlavní složkou membrány jsou tedy látky lipidové a proteinové povahy: jejich vzájemný poměr je cca 1:1 s variabilitou podle typu membrány (**Obr. 8**). Myelinová pochva obsahuje cca 75 % lipidů a tyto lipidy zde vykazují izolační funkci. Zatímco vnitřní mitochondriální membrána má vysoký obsah proteinů a to 75 % (transportní proteiny, enzymy dýchacího řetězce).

Pomocí membránových proteinů se uskutečňuje většina dynamických membránových procesů. Proteiny přenášejí látky (ionty, polární molekuly) a informace napříč membránou a membránové lipidy vytvářejí pro tyto děje vhodné prostředí.

Na zevní straně plazmatické membrány bývají často glykosylované (jako glykoproteiny). Existují dvě základní dělení membránových proteinů a to podle strukturního vztahu k membráně. **Integrální membránové proteiny** jsou zanořeny v membráně. Integrální proteiny značně interagují s uhlovodíkovými řetězci membránových lipidů. Mohou je uvolnit pouze látky, které soutěží o tyto nepolární interakce. Struktura transmembránových proteinů je předurčuje pro přenos signálu (receptory a s receptory asociované proteiny) a transport látek skrz membrány. Naopak **periferní membránové proteiny** jsou vázány k membráně slabě. Jsou vázány především elektrostatickými interakcemi a vodíkovými vazbami k polární částí fosfolipidů nebo k integrálním proteinům. Lze je (na rozdíl od integrálních proteinů) snadno oddělit změnou pH či iontové síly. Mají význam v intracelulárním přenosu signálu. [11, 12]





**Obr. 8:** Struktura membrány [11]

### 2.2.7 Fluidita membrán

Molekuly lipidů se mohou pohybovat v samotné membráně a vyměňovat si navzájem svá místa v rovině dvojné vrstvy. Membrána se chová jako dvojrozměrná tekutina, biologické membrány jsou proto také nazývány jako „tekuté mozaiky“.

Stupeň tekutosti buněčné membrány je důležitý pro funkci membrány a musí být udržován v určitých mezích. Míra tekutosti dvojné vrstvy při dané teplotě závisí na fosfolipidech, ze kterých se skládá, a zvláště na povaze uhlovodíkových řetězců: čím těsněji a pravidelněji se může řetězec sbalit, tím viskóznější a méně tekutá dvojná vrstva bude. Uspořádání uhlovodíkových řetězců v dvojné vrstvě ovlivňují především dvě jejich vlastnosti: délka a stupeň nasycení.

Uhlovodíkové řetězce fosfolipidů kolísají ve své délce od 14 do 24 atomů uhlíku, přičemž nejčastější jsou řetězce s 18-20 atomy uhlíku. Kratší řetězce způsobují zeslabení interakcí mezi řetězci mastných kyselin a membrána se stává tekutější. Mastná kyselina v poloze C-2 ve fosfolipidu obvykle obsahuje dvojnou vazbu v konformaci *cis*, což způsobí zahnutí („kolénko“) jinak přímého lineárního řetězce mastné kyseliny. Tato malá nepravidelnost v uhlovodíkovém řetězci znesnadňuje přikládání jednoho řetězce k druhému, a proto jsou lipidové dvojné vrstvy obsahující uhlovodíkové řetězce s vysokým stupněm nenasyacení tekutější než dvojvrstvy s malým obsahem dvojných vazeb v uhlovodíkových řetězcích.

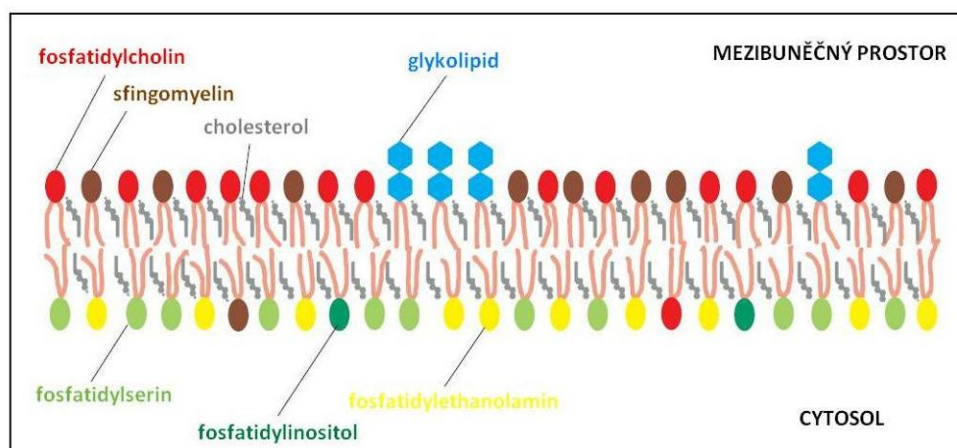
V živočišných buňkách je tekutost membrán snižována přítomností cholesterolu. Jeho krátké tuhé molekuly se vyskytují ve zvláště velkém množství v plasmatické membráně, kde vyplňují mezery mezi sousedními fosfolipidovými molekulami způsobené nepravidelnostmi v jejich nenasyčených uhlovodíkových řetězcích. Tímto způsobem cholesterol zpevňuje dvojnou vrstvu a činí ji méně tekutou a méně propustnou. [11, 12, 14]



### 2.2.8 Asymetrie membrán

Složení obou listů membrán je odlišné. Cytosolický list převážně obsahuje fosfolipidy s volnou aminoskupinou (fosfatidylethanolamin a zejména negativně nabitý fosfatidylserin), necytosolický list obsahuje fosfatidylcholin (a glykolipidy). Fosfatidylinositol je minoritní fosfolipid lokalizovaný převážně v cytosolickém listu membrány s důležitou funkcí při přenosu signálu. (**Obr. 9**)

Odlišné složení obou listů membrán je zachováváno, protože zatímco laterální difúze molekul fosfolipidů (jejich „míchání“ v rámci jednoho listu membrány) probíhá často a rychle, překlopení („flip-flop“) molekuly fosfolipidu z jednoho listu do druhého je termodynamicky velmi nepravděpodobné a dochází k němu zřídka (jednou za měsíc pro 1 molekulu, [14]). Odlišné složení obou listů membrány má funkční význam: negativní náboje serinových bazí fosfatidylserinu na cytosolické straně ovlivňují elektrické vlastnosti membrány a kumulace některých fosfolipidů v cytosolickém listu membrány je důležitou podmínkou přenosu signálu dovnitř buňky. Odlišné složení zevní plazmatické membrány u buňky, která nastoupila buněčnou smrt (apoptózu), je jedním ze signálů, podle kterých ji mohou ostatní buňky rozpoznat. [11, 12, 14]



**Obr. 9:** Asymetrické rozdělení fosfolipidů a glykolipidů v membráně [14]

### 2.3 Luminiscence

Absorpce energie (záření) v ultrafialové nebo viditelné oblasti vede u většiny molekul látek k následnému předání této energie při kolizích ostatním částicím. Řada analyticky významných sloučenin však takto ztrácí jen část získané energie a zbytek emituje jako tzv. luminiscenční záření.

Podle způsobu excitace lze luminiscenci rozdělit na fotoluminiscenci (excitace způsobená absorpcí světla), radioluminiscenci (excitace ionizujícím zářením), katodoluminiscenci (excitace paprskem elektronů), elektroluminiscenci (excitace elektrickým polem), termoluminiscenci (excitace vyvolaná zvýšením teploty po předchozím dodání tepla), chemiluminiscenci (excitace chemickými procesy), bioluminiscenci (excitace biologickými

pochody), triboluminiscence (excitace vzniká působením třecích sil) a sonoluminiscenci (excitace ultrazvukem). [15, 16, 17, 18]

### 2.3.1 Fotoluminiscence

Je-li excitace vyvolaná absorpcí fotonu, tento foton způsobí přechod absorbující látky do elektronového excitovaného stavu. Emise fotonů doprovázející deexcitaci je poté nazývána fotoluminiscencí. Fotoluminiscence se dělí na fluorescenci, fosforescenci a zpožděnou fluorescenci.

#### 2.3.1.1 Vznik fotoluminiscenčních spekter

Děje, které nastávají při absorpci a emisi světla se obvykle znázorňují pomocí Jablonského diagramu. Jablonského diagramy se používají v různých podobách pro zobrazení rozličných molekulárních pochodů: absorpce fotonu, vnitřní konverze, fluoresce, mezisystémový přechod, fosforescence, zpožděná fluoresce a triplet-triplet přechody.

Singletové elektronové stavy (základní, první a druhý excitovaný) jsou znázorněny jako  $S_0$ ,  $S_1$  a  $S_2$  a tripletové elektronové stavy jako  $T_1$  a  $T_2$ . Singletový stav je takový stav, kde jsou spiny obou elektronů antiparalelní, zatímco v tripletovém stavu jsou spiny elektronů paralelní. Každý elektronový stav se dále dělí na různé vibrační stavy. Při absorpci světla může elektron z valenční vrstvy přejít do jedné z vibračních hladin  $S_1$  a  $S_2$ . Poté dochází k celé řadě procesů.

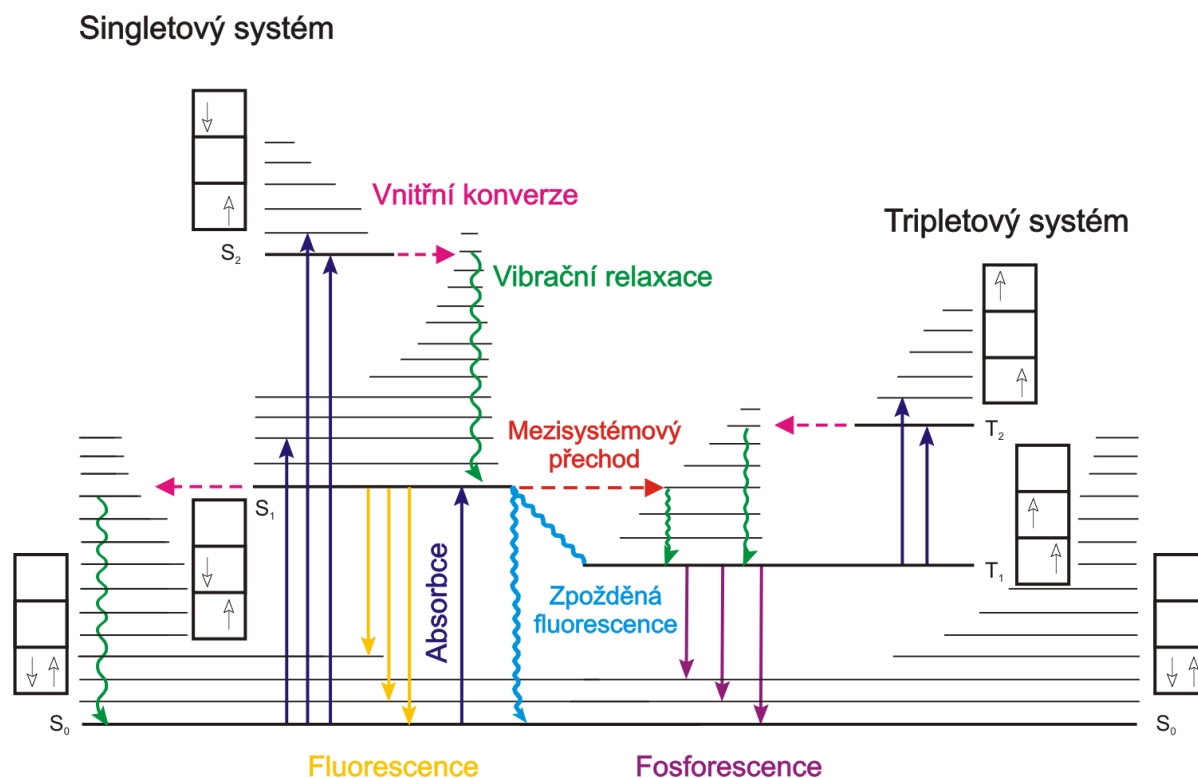
Vytvoření singletového stavu přímou excitací je z kvantově-mechanického hlediska nejpravděpodobnější. Excitovaná molekula se může zbavit přebytečné energie různými deaktivacími procesy: zářivými (emise světla), nezářivými (zvýšení tepelné energie systému) a fotochemickými reakcemi (fotodisociace excitované molekuly na fragmenty, spontánní izomerace molekuly, reakce s další molekulou). U zářivých procesů dochází k vyzáření fotonu a tyto procesy jsou v Jablonského diagramu značeny jako přímé šipky. Při nezářivých procesech nedochází k emisi záření, jelikož se nemění celková energie systému. Nezářivé procesy se v diagramu zobrazují jako vlnovky (**Obr. 10**).

**Vnitřní konverze** je nezářivý povolený přechod mezi dvěma elektronovými stavy o stejné spinové multiplicitě. Po tomto procesu následuje vibrační relaxace. **Vibrační relaxace** způsobí, že molekula excitovaná na vyšší energetickou hladinu než je nejnižší vibrační hladina daného elektronového stavu, rychle relaxuje na nejnižší elektronovou hladinu.

K **fluorescenci** dochází při emisi fotonů doprovázející  $S_1 \rightarrow S_0$  relaxaci. Tento proces je velmi rychlý a spinově dovolený díky zachování multiplicity. Doba života fluorescence je přibližně  $10^{-8}$  s. U fluorescence platí několik obecných charakteristik. Jednou z nich je Kashovo pravidlo, které říká, že fluorescence je následek přechodu stavu  $S_1$  na stav  $S_0$ . I když absorpce probíhá i do vyšších vibračních hladin elektronových stavů ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ), k fluorescenci dochází z nejnižší vibrační hladiny excitovaného stavu  $S_1$ . Tato nejnižší vibrační hladina je dosažena vnitřní konverzí s následnou vibrační relaxací. Vše je způsobeno tím, že mezi vyššími excitovanými stavy a stavem  $S_1$  je velmi malý energetický rozdíl a nezářivá přeměna z těchto stavů na  $S_1$  je velmi rychlá. Další charakteristikou je Stokesův

zákon podle něhož je vlnová délka emise fluorescence větší než vlnová délka absorpce. Tedy fluorescenční spektrum se nachází oproti absorpčnímu spektru u vyšších vlnových délek (nižší energie), což je způsobeno ztrátou energie v excitovaném stavu při vibrační relaxaci. Třetí obecnou vlastností fluorescence je, že fluorescenční emisní spektra jsou nezávislá na excitační vlnové délce. Tato vlastnost se nazývá Vavilovo pravidlo a vychází z Kashova pravidla.

Zakázaný nežářivý přechod mezi stavy s rozdílnou spinovou multiplicitou se nazývá **mezisystémový přechod** (např.  $S_1 \rightarrow T_1$ ). K tomuto přechodu dochází díky inverzi spinu elektronu. Přechod se může uskutečnit buď přímou spin-orbitální interakcí  $S_1$  do vyšší vibrační hladiny  $T_1$  nebo spin-orbitální interakcí  $S_1$  do vyššího tripletového stavu  $T_n$ . Mezisystémový přechod je provázen dalšími procesy: fosforescencí, zpožděnou fluorescencí a triplet-triplet přechody. **Fosforescence**, nebo-li zářivý zakázaný proces, je emise fotonů z  $T_1$  na některou elektronovou hladinu základního stavu  $S_0$ . Tripletový stav  $T_1$  je energeticky níže než stav  $S_1$ , a proto je vlnová délka fosforescence delší než u fluorescence. Doba života fosforescence se pohybuje v řádu milisekund až sekund. Delší doba života je přímý následek kvantově mechanicky zakázaného zářivého přechodu  $T_1 \rightarrow S_0$ , jelikož se mění multiplicita. Jedním z dalších procesů je **zpožděná fluorescence**, kdy tepelnou aktivací dojde ke zpětnému mezisystémovému přechodu z  $T_1$  na  $S_1$ . K tomuto přechodu dochází v případě, že energetický rozdíl mezi stavy  $T_1$  a  $S_1$  je malý. Po přechodu  $T_1 \rightarrow S_1$  následuje emise záření v souvislosti s přechodem  $S_1 \rightarrow S_0$ . Jakmile je molekula excitována a dosáhne tripletového stavu  $T_1$ , může absorbovat další foton o jiné vlnové délce a dochází k tzv. **triplet-triplet přechodům**. [17, 18, 19]



*Obr. 10: Jablonskiho diagram*

### 2.3.2 Vlastní fluorescence

Vlastní fluorescenci vykazují tyto látky (vlastní, vnitřní, „intrinsic“ fluorofory):

- proteiny (tryptofan, tyrozin, fenylalanin) – fluorescence v ultrafialové oblasti
- redukované formy nikotinamidadenindinukleotidu (NADH), nikotinamidadenindinukleotid fosfátu (NADPH), oxidované formy flavoproteinů, vitamin A – fluorescence ve viditelné oblasti (modrá až žlutá)
- cytochromy, peroxidáza, hemoglobin, myoglobin, chlorofyl – fluorescence ve viditelné oblasti (červená) [17, 20]

### 2.3.3 Nevlastní fluorescence

Vnější, neboli nevlastní fluorofory se používají mnohem více než vnitřní. Mezi takovéto fluorofory patří fluorescenční sondy a značky. Řadí se k nim například některé organické látky se systémem dvojných konjugovaných vazeb, polovodičové nanočástice či fluorescenční proteiny. Současné chemické a biologické metody umožňují těmito sondami označit selektivně právě jeden druh molekul, a tak lze pomocí fluorescence získávat informace o rozmístění, pohyblivosti a vlastnosti mikrookolí jediného druhu molekuly přítomného ve složitých systémech. Fluorescence je přitom citlivá na širokou škálu parametrů například na polaritu, viskozitu, koncentraci různých iontů a látek přítomných v mikrookolí dané sondy.

Fluorescenční značka je spojena se sledovanou látkou kovalentní vazbou, narozdíl od fluorescenční sondy, která se váže ke sledované struktuře nekovalentně a často přitom mění své fluorescenční vlastnosti. Značky a sondy jsou velmi důležitými nástroji především v bioanalytice. [17, 18, 20]

#### 2.3.3.1 Fluorescenční značky

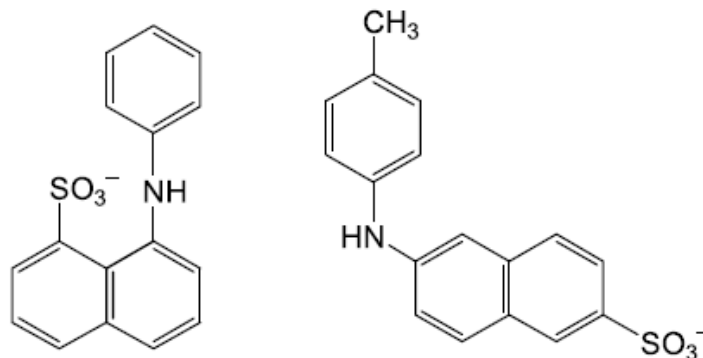
Fluorescenční značky nachází uplatnění při analytickém stanovení (případně v kombinaci se separační metodou), ve fluorescenční mikroskopii, pro značení buněk a tkání, při fluorescenčních imunoanalytických metodách („immunoassays“) a při měření vzdálenosti funkčních skupin. Mezi kritéria pro výběr fluorescenčních značek patří spektrální vlastnosti (excitace, emise, kvantový výtěžek atd.), vazebné místo ( $-NH_2$ ,  $-SH$  skupina a další), podmínky reakce (pH, koncentrace,...) a další vlastnosti (acidobazicitu, hydrofobicitu).

Nejznámějšími fluorescenčními značkami jsou fluoresceinizothiokynát (FITC) a tetrametylrhodaminizothiokyanát (TRITC), které se používají v imuno fluorescenčních metodách. Další často používanou fluorescenční značkou je dansyl chlorid (DNS-Cl), který stejně jako FITC reaguje s volnými aminoskupinami proteinů. [18, 20]

#### 2.3.3.2 Fluorescenční sondy

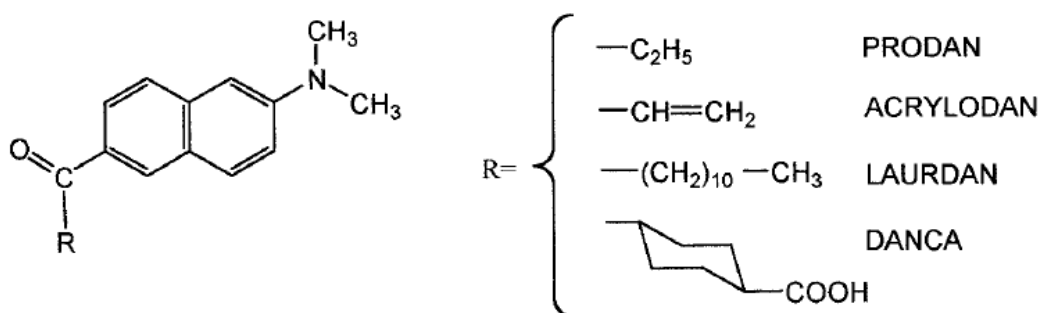
Mezi fluorescenční sondy se řadí sondy polaritní, které mění své spektrální vlastnosti v závislosti na polaritě prostředí. Jednou z nejznámějších polaritních sond je ANS (1-anilino-8-naftalen sulfonová kyselina), která nefluoreskuje ve vodných roztocích avšak vykazuje vysokou intenzitu fluorescence v rozpouštědlech o nízké polaritě. Tato její vlastnost

umožňuje sledovat pouze hydrofobní oblasti biologických systémů (žádné interference od molekul ANS jež zůstávají v okolním vodném prostředí, jelikož ty nefluoreskují). ANS a její derivát **TNS** (*p*-toluidinyl-6-naftalen sulfonová kyselina) se často používají ke značení proteinů, biologických membrán a micelárních systémů.



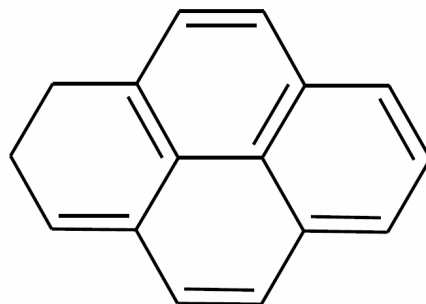
**Obr. 11:** ANS a TNS

Další významnou polaritní sondou je **PRODAN** (*N, N*-dimethyl-6-propionyl-2-naftylamin), který na rozdíl od ANS nemá žádný náboj. PRODAN se využívá ke sledování polaritě různých chemických a biologických systémů (vazebná místa proteinů, fosfolipidové membrány). Použití také našly rozmanité deriváty této sondy. DANCA specificky interaguje s N-H skupinami vazebných míst proteinů a ACRYLODAN se na proteiny kovalentně váže k -SH skupinám. LAURDAN vzniká nahrazením ethylové skupiny skupiny PRODANU za C11 pararifinický řetězec. Tato sonda je vhodná ke studiu fosfolipidových váček.



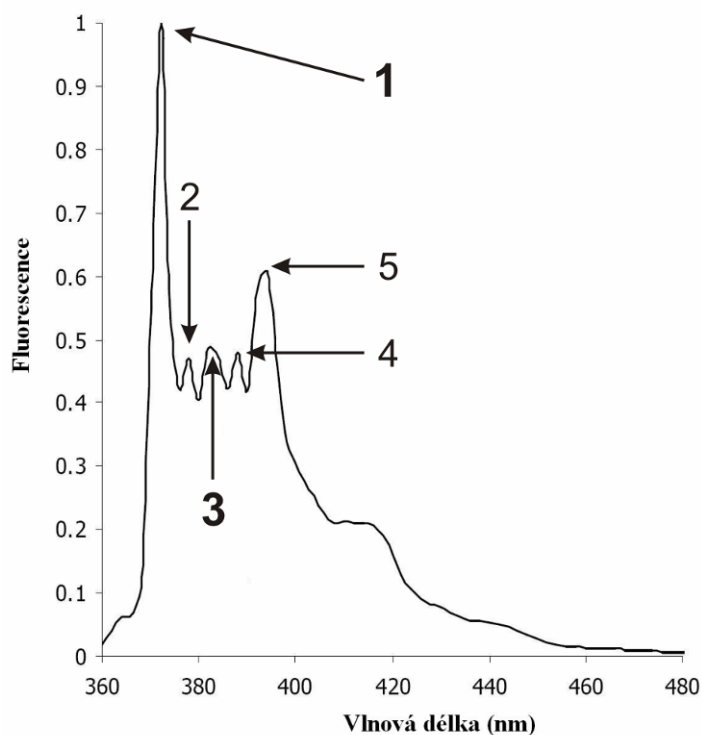
**Obr. 12:** PRODAN a jeho deriváty

**Pyren** je aromatická sloučenina s vysokou symetrií a se specifickou reakcí na polaritu svého okolí. Tato sonda slouží k přesnému určení kritické micelární koncentrace a dále ke zjišťování míry pronikání vody do micel a lipidových dvojvrstev.



**Obr. 13:** Pyren

Fluorescenční emisní spektrum pyrenu ve vodě vykazuje pět hlavních píků. Přechod 0-0 je silně závislý na polaritě okolí. Tento přechod (značený jako 1) se nachází u vlnové délky 373 nm. Přechod 0-2 (značený jako 3) při 383 nm je tzv. referenční pás (**Obr. 14**).

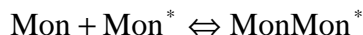


**Obr. 14:** Emisní spektrum pyrenu s vibračně rozlišenou strukturou

Ze závislosti poměrů fluorescence u pásů 1 a 3 na koncentraci se dá stanovit CMC. Tento poměr 1:3 vyjadřuje polaritu okolí pyrenu. V polárním prostředí se pohybuje kolem hodnoty 1,7 a v nepolárním prostředí kolem 0,5. Je-li proces asociace koncentračně závislý, je možno závislost poměru 1:3 na logaritmu koncentrace popsat Boltzmannovou S-křivkou obsahující 4 parametry a to: maximum, minimum, inflexní bod a gradient  $\Delta x$ .

### 2.3.4 Excimer

Excimery jsou dimery v excitovaném stavu. Excitovaný dimer, zkráceně excimer ( $\text{MonMon}^*$ ), vzniká kolizí excitované molekuly ( $\text{Mon}^*$ ) se stejnou avšak neexcitovanou molekulou ( $\text{Mon}$ ).



Některé aromatické uhlovodíky (jako naftalen či pyren) mohou tyto excimery vytvářet. Se zvýšením koncentrace látky ve „volném“ rozpouštědle narůstá tvorba excimeru, roste jeho fluorescenční emisní pás při 470 nm a dojde ke snížení fluorescence monomeru. Fluorescenční pás excimeru je oproti monomeru lokalizován u vyšších vlnových délek a nevykazuje vibračně rozlišenou strukturu. [17, 18]

### 2.3.5 Instrumentace

Přístroje pro pozorování a měření fotoluminiscence v jednopaprskovém uspořádání zahrnují zdroj excitačního záření, dva monochromátory (excitační a emisní), kyvetu a detektor. Rozlišujeme dva typy přístrojů:

a) fluorimetr

- slouží k měření celkové fluorescence
- kvantitativní analýza
- zdroj záření: lampa nebo laser (větší citlivost stanovení)
- místo monochromátoru(ů) může být filtr

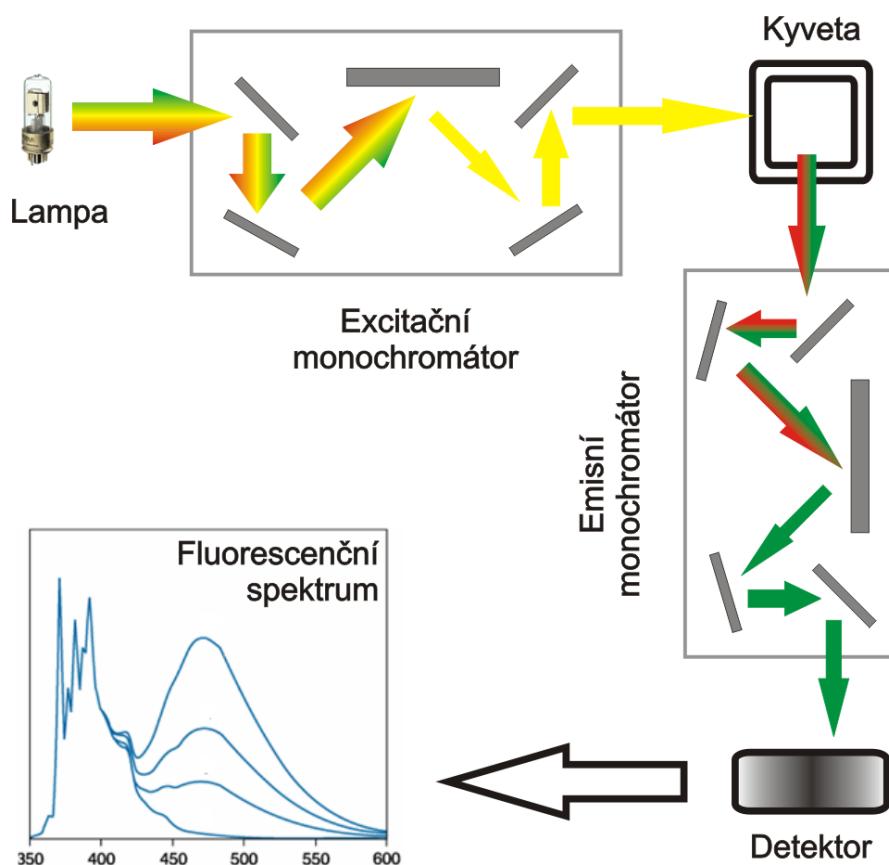
b) spektrofluorimetr

- měření fluorescenčních (emisních a excitačních) spekter
- zdroj záření: zpravidla lampa (možnost volby vlnové délky excitačního záření)
- možné další režimy (synchronní sken, časově závislá fluorescence aj.) [15, 21]

#### 2.3.5.1 Fluorescenční spektrometr

Přístroj má svůj zdroj excitačního záření, dva monochromátory (excitační a emisní, vybírají záření o určité vlnové délce), kyvetu se vzorkem, detektor (na který dopadá emisní záření) a vyhodnocovací zařízení (obvykle počítač). Emisní záření se měří v kolmém směru k excitačnímu záření (**Obr. 15**).

Při záznamu excitačního spektra se mění plynule vlnová délka záření, která vychází z excitačního monochromátoru. Druhý, emisní monochromátor, je nastaven na určitou konstantní vlnovou délku, zpravidla odpovídající vlnové délce maxima fluorescenční emise. Při záznamu emisního spektra je tomu naopak. [15, 20]



*Obr. 15: Schéma fluorescenčního spektrometru*

## 2.4 Současný stav řešené problematiky

**Ronchetti, Ghosh a spol.** studovali interakce hyaluronan-fosfolipid s použitím negativního barvení a elektronového mikroskopu. Hyaluronan o různé molekulové hmotnosti (170 kDa, 740 kDa a 1,9 MDa) byl přidán do fosfolipidových suspenzí (DPPC nebo lecitin), které byly buď ve formě unilamelárních částic nebo multilamelárních vesikul. Suspenze byly jemně míchány a inkubovány při různých teplotách od 24 hodin až po 7 dnů. Po 24 hodinách unilamelární částice i multilamelární vesikuly změnilly v přítomnosti HA svoji organizaci. Vznikly struktury podobné perforovaným membránám a 12 nm silné válce s tendencí agregovat a tvořit listy. Tyto struktury byly pozorovány pouze v přítomnosti vysokomolekulární HA, zatímco nízkomolekulární HA (170 kDa) způsobila fragmentaci liposomů.

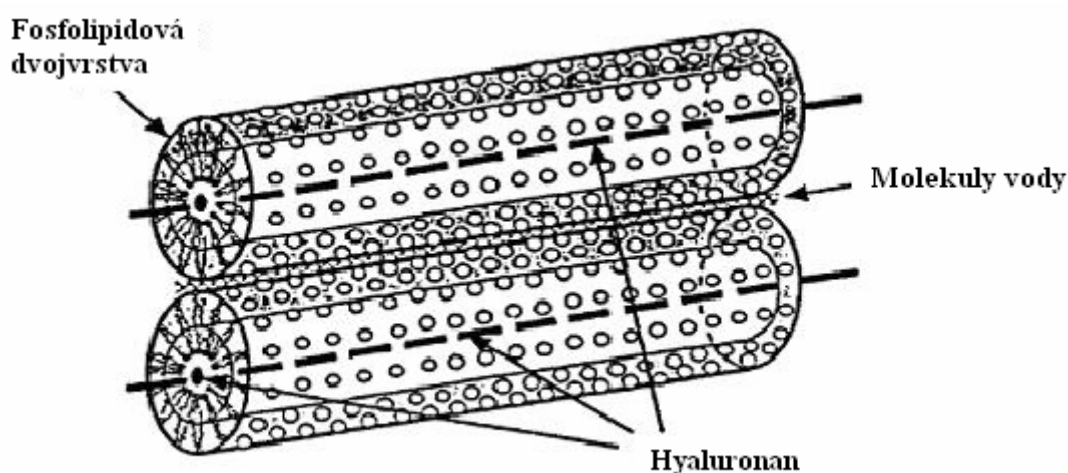
Zdá se, že interakce na použitém fosfolipidu (DPPC a vaječný lecitin poskytly podobné výsledky) a též na iontech v mediu jsou nezávislé. Interakce jsou však ovlivňovány molekulovou hmotností HA, zdají se být energeticky příznivé a nevyžadují pro vytvoření použití ultrazvuku ani jiné extrémní procedury.

Negativním barvením a elektronovým mikroskopem bylo zjištěno, že nízkomolekulární HA váže molekuly fosfolipidu a má tendenci fragmentovat velké fosfolipidové membrány a formovat globule, které následně agregují. Vysokomolekulární HA složená z dlouhých vzájemně propojených vláken vytvářejících volnou trojrozměrnou síť organizuje kolem těchto



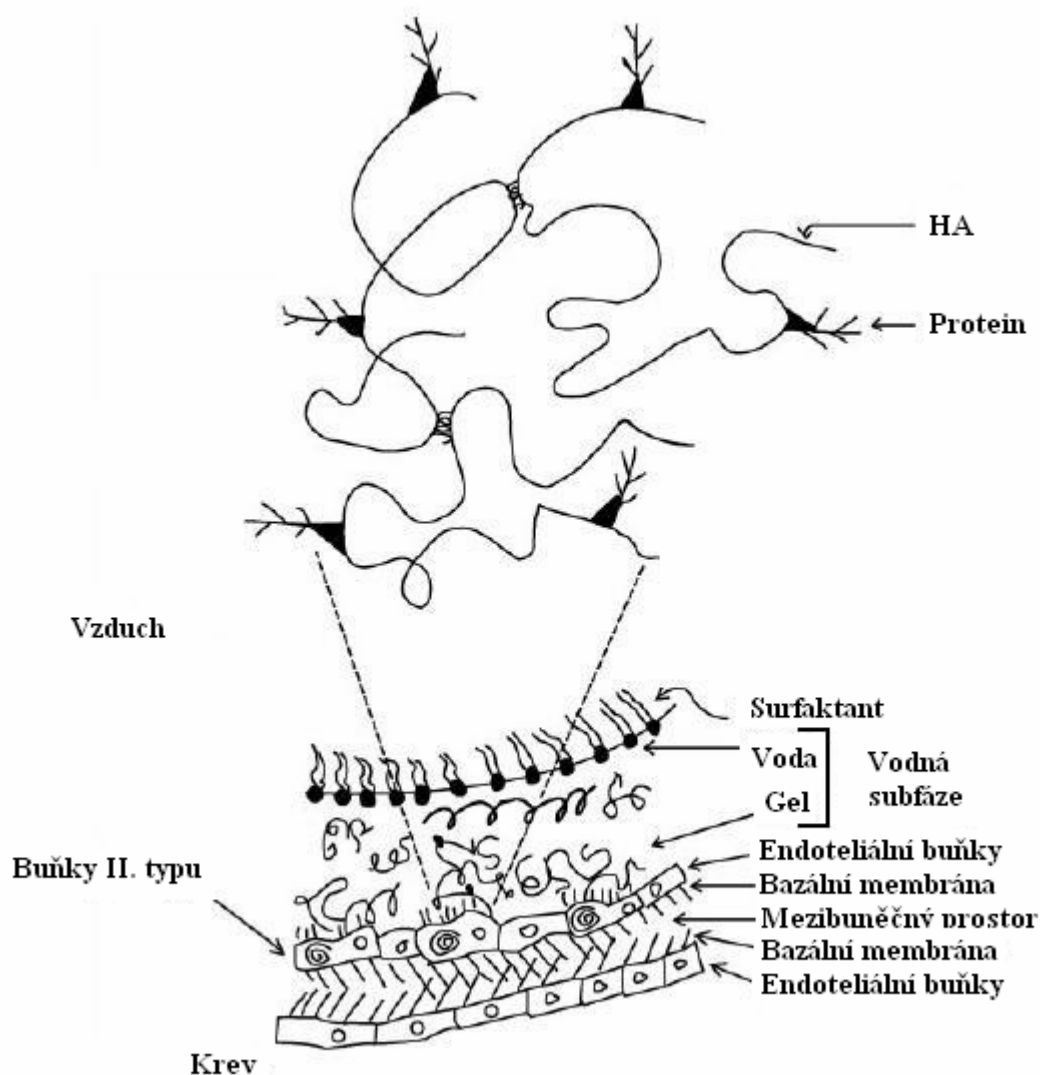
vláken molekuly fosfolipidů. Tak vznikají 12 nm silná vlákna, která mohou buď tvořit síť, nebo se seřadit paralelně do velkých listů.

Elektronový mikroskop poskytuje trojrozměrný obraz objektů, ve kterém jsou vlákna interpretována jako válce. Jeden válec je tvořen molekulou HA, jež zde zastává funkci centrálního vlákna obklopeného fosfolipidovou dvojvrstvou, ve které jsou molekuly fosfolipidu paprskovitě orientované podél centrálního jádra HA. Nabitě konce fosfolipidových molekul umožňují vytvoření tenké vrstvy vody mezi přilehlými válci. Čím delší je řetězec HA, tím je připojeno více molekul fosfolipidů, což má za následek rozsáhlejší a tedy silnější intermolekulární fosfolipidové interakce vedoucí k tvorbě listů (**Obr. 16**). [22]



**Obr. 16:** Navržený model interakcí HA-lipid [22]

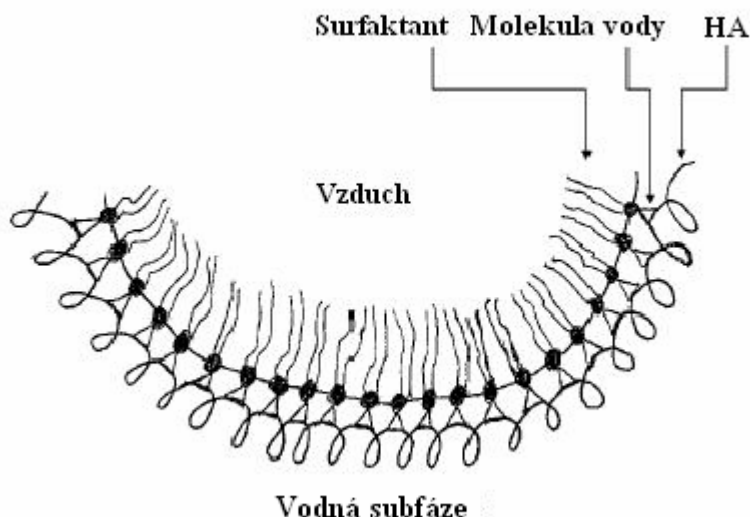
**Bray a spol.** se zabývali otázkou, jakou roli hraje hyaluronan v plicních sklípcích. Ve stěně plicních sklípků se epitelální buňky II. typu specializují na produkci surfaktantu a také vylučují hyaluronan do vodné subfáze. Hyaluronan se v extracelulární matrix váže na buněčné povrchové receptory a proteiny. Síť z agregovaného hyaluronanu s proteiny nebo bez proteinů vytváří hydrofilní gely, jejichž vlastnosti závisí především na molekulové hmotnosti hyaluronanu a jeho koncentraci. Hyaluronan je také znám tím, že interaguje s fosfolipidy a má hydrofobní oblasti, které by se mohly vázat k hydrofobním povrchově aktivním proteinům B a C. **Obr. 17** znázorňuje primární hypotézu, kdy je hyaluronan přítomen ve vodné subfázi plicních sklípků, a jeho funkcí je zde vytvořit hydrofilní gel pomocí agregace a specifickými interakcemi s proteiny. Koncentrace HA a ostatních proteinů bude největší na buněčné stěně, a tak zde bude gel nejvíce strukturovaný. Na rozhraní vzduchu bude však především voda, na níž mohou být rozšířeny povrchově aktivní lipidy.



**Obr. 17:** Navržený model interakcí HA-lipid [23]

Přímé interakce HA s povrchově aktivním fosfolipidem k vytvoření povrchově aktivní vrstvy nejsou nezbytné. Přesto tyto interakce mohou zvýšit stabilitu povrchově aktivní vrstvy. HA a fosfolipidy spolu interagují a vytvořené struktury lipidů jsou ovlivněny molekulovou hmotností HA. Nabité polární oblasti fosfolipidů interagují s HA nejspíše tak, že kvartérní aminoskupina dipalmitoylfosfatidylcholinu (DPPC) je přitahována ke karboxylové skupině HA. Tento model umožňuje mnoho možných míst kontaktu. DPPC a protiionty HA jsou zde však ve vzájemné konkurenci o tyto kontaktní místa.

Sekundární hypotéza naznačuje, že molekuly vody jsou vodíkovými můstky navázány k HA s jistou pravidelností podél řetězce. Předpokládá se, že tyto hydrofilní oblasti na molekule HA přitahují polární části fosfolipidů a fosfolipidy se orientují podél molekuly HA (**Obr. 18**). Tato hypotéza přímé interakce HA s fosfolipidem zvyšující stabilitu povrchově aktivní vrstvy však nemá analogii v žádných jiných tkáních. [23]



**Obr. 18:** Sekundární hypotéza - přímé interakce HA s fosfolipidem [23]

**Steffan a spol.** zkoumali pomocí kalorimetrické a fluorescenční spektroskopie interakce polyanionických polysacharidů (chondroitin sulfát, heparin, dextran sulfát, HA a karboxymethyldextran) obsahujících  $\text{Ca}^{2+}$  s různými druhy liposomů. Došli k závěru, že interakce anionických polysacharidů s fosfolipidovými membránami je zapříčiněna přítomností kationů (o určité elektronové konfiguraci a iontovém poloměru). Interakce závisí na stupni sulfatace polysacharidu a délce řetězce a také na druhu fosfolipidu. [24]

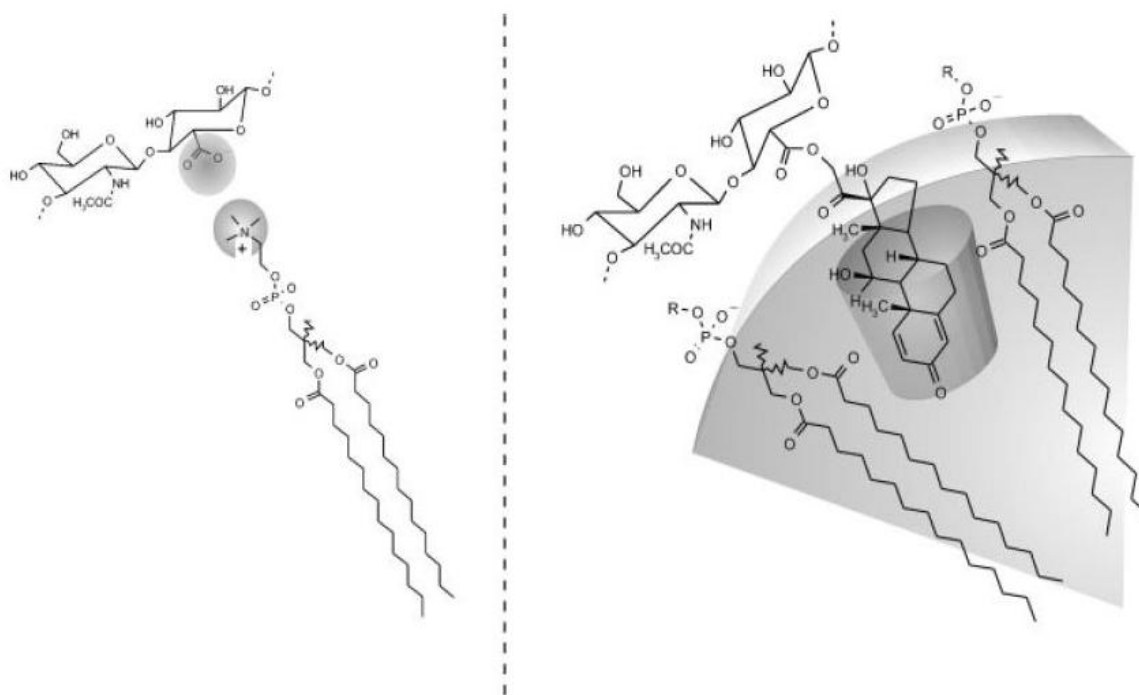
Tým pod vedením **P. Ghoshe** studoval s využitím  $^1\text{H}$ -NMR spektroskopie, gelové permeační chromatografie a multiangle laser light scattering (MALLS) interakce HA o rozdílné molekulové hmotnosti s dipalmitoyl-D,L- $\alpha$ -fosfatidylcholinem (DPPC). Zjistili, že aplikací ultrazvuku na směs DPPC s vysoko a nízkomolekulární HA se značně zvýší flexibilita řetězce HA. Z naměřených dat vyvodili, že DPPC se váže k HA. HA obsahuje opakující se hydrofobní oblasti, které mají schopnost podléhat intra- a inter-řetězcovým hydrofobním interakcím. Formulovali hypotézu, kde hydrofobní molekuly (jako jsou fosfolipidy) mohou soupeřit o intra- a inter-řetězcová vazná místa HA, čímž ovlivňují její flexibilitu a konformaci ve vodném roztoku. Intra- a inter-řetězcové interakce v artritickém kloubu mohou podle této hypotézy redukovat viskoelasticitu synoviální tekutiny a tím snižovat schopnost média chránit kloubní chrupavku před mechanickým poškozením. [25]

Další skupina v čele s **Nitzanem** se zaměřila na roli HA v ochraně povrchově aktivních fosfolipidů (surface-active phospholipids = SAPLS, které představují hlavní ochranný lubrikant kloubní synoviální tekutiny) před jejich lýzou způsobenou exogenní fosfolipázou  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ). První hypotézou bylo, že vysokomolekulární HA inhibuje aktivitu  $\text{PLA}_2$  a tak chrání integritu SAPLS. V případě nadměrného zatížení kloubu či během zánětlivého procesu jsou generovány reaktivní oxidanty, které jsou známé svou vysokou schopností degradovat HA a tím i omezovat její syntézu. Druhá hypotéza předpokládala, že degradovaná forma HA (dHA) ztrácí svou schopnost inhibovat aktivitu  $\text{PLA}_2$ , a tak je SAPL více náchylná k  $\text{PLA}_2$  lýze. Zjišťovali jaký vliv bude mít zvyšující se koncentrace HA (degradovaná volnými radikály a

nedegradovaná) na lýzovou aktivitu PLA<sub>2</sub>. Použili liposomy (lipidický model membrány) obsahující fosfolipidcholin (PC) jako substrát za předpokladu, že tyto liposomy jsou shodnými zástupci SAPL. Z výsledků provedených testů potvrdili správnost obou hypotéz. Prokázali, že HA adheovaná k fosfolipidové membráně (liposomu) inhibuje jejich lýzu vyvolanou PLA<sub>2</sub> a degradovaná forma HA neinhibuje lýzovou aktivitu PLA<sub>2</sub> a tedy urychluje lýzu. [26]

**Taglienti a kolektiv** zkoumali s využitím PFG NMR (Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance) interakce hyaluronanu a jeho derivátů s lipidy a proteiny. Jako koloidní systém obsahující HA použili hydrofobně modifikované HA deriváty získané esterifikací karboxylové skupiny methylprednisolem (45 a 60 % karboxylových skupin v HYCp45 a HYCp60) a porovnávali jejich chování s nativní HA. Tyto makromolekuly mohou být považovány za samostatně asociující přenašeče léků, jelikož methylprednisol je steroidní protizánětlivý lék a může být uvolněn při hydrolýze esterové vazby mezi karboxylovou skupinou HA a hydroxylovou skupinou v pozici C-21. Také mohou být použity jako obecný model pro jakékoli samovolně agregující koloidní struktury, které vykazují přítomnost HA na svém povrchu.

Buňky rozpoznávají koloidy jakožto cizí tělesa pomocí mononukleárního fagocytového systému (MPS) a toto rozpoznání je zprostředkováno adsorpcí komponent tělních tekutin. Těmito komponentami jsou proteiny plasmy, ale možná také lipidy. Z tohoto důvodu studovali interakce HYCp45 a HYCp60 se dvěma rozdílně nabitými fosfolipidy a to s DPPC (dipalmitoyl-D,L- $\alpha$ -fosfatidylcholin) a DPPG (1,2-dipalmitoyl-sn-3-fosfo-rac-(1-glycerol) sodná sůl). Tyto fosfolipidy mají identické hydrofobní konce, ale rozdílné náboje. DPPC má ve fyziologickém pH zwitterionický náboj, DPPG anionický. Pomocí PFG NMR zjistili, že DPPC liposomy vykazují mnohem větší interakce s HA/HYCs než DPPG liposomy. Výsledek může být vysvětlen rozdílnou elektrostatickou situací: navzdory zwitterionickému charakteru DPPC má povrch liposomů částečný pozitivní charakter, který může přitahovat negativně nabitě karboxylové skupiny (**Obr. 19**, vlevo), zatímco DPPG je odpuzuje. Tyto interakce (jak pro DPPC tak pro DPPG) jsou silnější s hydrofobními polymery. Silnější interakce liposomů s HYCs mohou být vysvětleny začleněním methylprednisolonových skupin do dvojvrstvy (**Obr. 19**, vpravo). [27]



**Obr. 19:** Možné interakce systémů (derivatizované) HA/liposom. [27]

Cílem práce vedené **Forseyem a spol.** bylo určit schopnost HA, DPPC (dipalmitoyl fosfatidylcholin) a směsí HA s DPPC redukovat počáteční tření v osteoartritidou zničených lidských chrupavkách, kdy nejvyšší hodnoty tření se objevují na začátku pohybu po dlouhodobém namáhání. Dále byl pomocí fluorescenčně značené HA a konfokální mikroskopie zkoumán rozsah pronikání HA do tkáně chrupavky.

Nejdříve byl studován vliv samotné HA a samotného DPPC. Bylo zjištěno, že jejich použití na zničenou lidskou chrupavku mělo za následek zlepšení lubrikace mezi povrchy chrupavky. Účinnost HA nebyla závislá na koncentraci, nicméně u DPPC měla koncentrace vliv na jeho schopnost lubrikovat. Přídavek DPPC liposomů k vysokomolekulární HA vykazoval zvýšenou lubrikační schopnost a lepší ochranu chrupavkové tkáně. Příčina těchto vlivů není plně známa, avšak tyto studie naznačují důležitost lipidů v lubrikaci chrupavky a zvýrazňují jeho potenciál coby prospěšné přísady v terapeutických lubrikantech obsahujících HA.

Fluorescenčně značená HA vytvořila obal na povrchu chrupavky. Časem některá HA penetrovala do vrstev chrupavky, kde se výlučně zaměřila na chondrocyty v povrchové a střední zóně. Toto proniknutí dosáhlo až přibližně do 300  $\mu\text{m}$  od povrchu chrupavky. HA svými interakcemi s chondrocyty může stimulovat syntézu nových molekul HA a také snížit produkci a aktivitu prozánětlivých mediatorů. Zjištěná penetrace HA do chrupavky a její následná asociace s chondrocyty podpořila tvrzení, že HA má dlouhotrvající terapeutický účinek. [28]

Záměrem práce **Huanga a kolektivu** bylo vytvořit komplex HA a fosfolipidů (PL) a studovat podpůrný efekt PL na orální absorpci HA. Existuje několik omezení, která ovlivňují gastrointestinální absorpci exogenní HA podávané orálně, například její vysoká  $M_r$  a nízká rozpustnost v tucích. PL jsou hlavním stavebním materiálem biologických membrán a jsou

kompatibilní s tkáněmi. PL mohou zlepšit gastrointestinální absorpci léků. Komplex PL tak hraje důležitou roli při zvyšování terapeutického účinku léků. Komplex HA-PL (nazván Haplex) byl připraven disperzí filmu a použitím ultrazvuku. Pomocí infračervené spektroskopie a diferenční skenovací kalorimetrie (DSC) se ukázalo, že fyzikálně-chemické vlastnosti Haplexu se liší od vlastností samotné HA a samotného PL. Následně byla studována orální absorpce Haplexu. Po podání komplexu krysám byla určována koncentrace HA v séru. Experiment potvrdil, že exogenní HA byla absorbována do krve po orálním podání, po vytvoření komplexu Haplex mohou PL obsažené v Haplexu podpořit orální absorpci exogenní HA, zvýšit koncentraci HA v séru a prodloužit dobu absorpce HA. [29]

### 3. MATERIÁLY A METODY

#### 3.1 Použité chemikálie

##### Fosfolipidy

1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin = lecitin, typ XVI-E (Sigma Aldrich, ~ 99 %, CAS 8002-43-5, č. šarže: 118K5206). Lecitin obsahuje různé mastné kyseliny, jež jsou přibližně zastoupeny v tomto množství: 33 % 16:0 (palmitová kyselina), 13 % 18:0 (stearová kyselina), 31 % 18:1 (olejová kyselina), 15 % 18:2 (linoleová kyselina) a minoritní zbytek (ostatní mastné kyseliny). [31]

1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin = DPPC, semisyntetický (Sigma Aldrich, ≥ 99 %, CAS 63-89-8, č. šarže: 078K5203)

##### Hyaluronan

Hyaluronan ( $M_w = 73$  kDa, CPN spol. s r.o., č. šarže: 071207-P1)

Hyaluronan ( $M_w = 300$  kDa, CPN spol. s r.o., č. šarže: 160708-E1)

Hyaluronan ( $M_w = 1,4$  MDa, CPN spol. s r.o., č. šarže: 141008-E1)

##### Rozpouštědla

Aceton p.a. (Lach-Ner spol. s r.o., ≥ 99,5 %, CAS 67-64-1, č. šarže: 1302030210 )

Chloroform (Lach-Ner spol. s r.o., CAS 67-66-3, č. šarže: PP/2008/05926/0)

Mili-Q-voda

##### Sondy

Pyren (Fluka, ≥ 99,0 %, CAS 129-00-0, puriss p.a. for fluorescence, č. šarže 430166/1)

Perylen (Fluka, ≥ 99,0 %, CAS 198-55-0, č. šarže 384079/1)

#### 3.2 Metody

##### 3.2.1 Příprava vzorků

Nejdříve byl připraven zásobní roztok fosfolipidu (lecitin, DPPC) o koncentraci  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Bylo naváženo příslušné množství fosfolipidu, které bylo rozpuštěno v chloroformu. Chloroform byl následně odpařen a byla přidána Mili-Q-voda. Roztok byl promíchán (Vortex) a sonifikován při teplotě  $30^\circ\text{C}$  po 30 minut. Výsledný zásobní roztok lecitinu ve vodě byl mírně zakalený a byl uchováván v lednici při teplotě  $4^\circ\text{C}$ . Dále byly připraveny zásobní roztoky fluorescenčních sond v těkavém rozpouštědle (aceton). Zásobní roztoky fosfolipidu a fluorescenčních sond byly uchovávány v lednici při teplotě  $4^\circ\text{C}$ .

Při přípravě vzorků pro sledování agregačního chování fosfolipidu (lecitin, DPPC) ve vodě byly použity průhledné skleněné vialky o objemu  $10 \text{ cm}^3$ , do kterých bylo pipetováno takové množství zásobního roztoku fluorescenční sondy ( $10^{-4} \text{ M}$ ) v těkavém rozpouštědle (aceton), aby po odpaření rozpouštědla a doplnění vzorku na celkový objem, byla konečná koncentrace v roztoku při použití pyrenu  $1 \cdot 10^{-6} \text{ M}$  a při použití perylenu  $2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ . Do takto připravených vialek byly pipetovány zásobní roztoky příslušného fosfolipidu o různém

množství tak, aby bylo dosaženo proměnné koncentrace fosfolipidu ve vzorcích. Poté byl vzorek doplněn Mili-Q vodou na celkový objem a byl ponechán do druhého dne na třepačce při laboratorní teplotě.

Při přípravě vzorků pro sledování agregačního chování fosfolipidu (lecitin, DPPC) v přítomnosti nativního hyaluronanu bylo v průhledných skleněných vialkách o objemu  $10\text{ cm}^3$  odpařeno takové množství zásobního roztoku pyrenu v acetonu, aby jeho koncentrace po doplnění vzorku na celkový objem činila  $1 \cdot 10^{-6}\text{ M}$  a při použití perylenu jako sondy byla tato koncentrace  $2 \cdot 10^{-6}\text{ M}$ . Postup míchání jednotlivých složek byl následující. Nejprve byl pipetován náležitý objem zásobního roztoku hyaluronanu, tak aby jeho koncentrace ve vzorcích byla konstantní, poté následoval přídavek vody. Nakonec byl pipetován zásobní roztok fosfolipidu v různém množství, aby bylo dosaženo proměnné koncentrace fosfolipidu ve vzorcích. Takto připravené vialky byly míchány na míchačce do druhého dne při laboratorní teplotě.

Všechna měření byla opakována třikrát, přičemž výsledné hodnoty vynesené v grafech jsou průměrné hodnoty těchto měření. Grafy byly zpracovány v programu MS Excel a chybové úsečky, které jsou v grafech znázorněny byly vytvořeny pomocí funkce SMODCH.

### 3.2.2 Měření a vyhodnocení dat

#### 3.2.2.1 Pyren

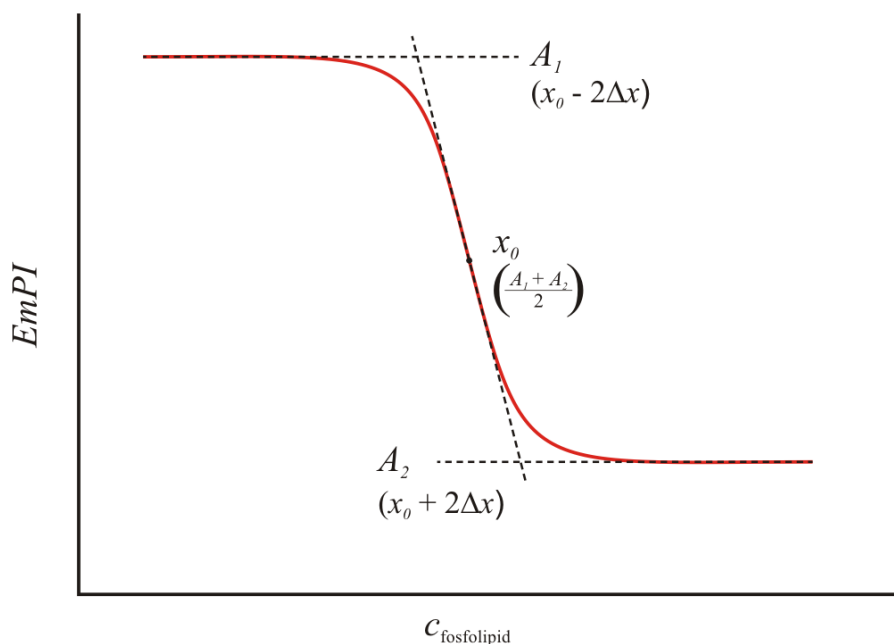
Fluorescenční emisní a excitační spektra byla měřena pomocí fluorimetru AMINCO Bowman Series 2. Při měření vzorků obsahujících pyren byl monochromátor excitace nastaven na 336 nm a monochromátor emise na 392 nm. Měření byla prováděna při teplotě  $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Měření byly emisní skeny v rozsahu od 360 nm do 540 nm, při rychlosti skenu  $5\text{ nm.s}^{-1}$ . V emisním spektru pyrenu byly sledovány intenzity prvního ( $I_1$ , 373 nm) a třetího ( $I_3$ , 382 nm) maxima. Dále byla sledována intenzita fluorescence excimeru ( $I_E$ , 470 nm). Z těchto sledovaných parametrů byly určeny poměry  $I_1/I_3$  (emisní polaritní index,  $EmPI$ ) a  $I_E/I_1$  (poměr emisního pásu excimeru ku emisnímu pásu monomeru,  $E/M$ ). Ze závislosti poměrů  $I_1/I_3$  na koncentraci byla určena CAC.

Naměřená data byla vyhodnocena na základě proložení získaných závislostí Boltzmannovou křivkou. Na **Obr. 20** je znázorněn sigmoidní tvar Boltzmannovy křivky a její charakteristické parametry. Rovnice této křivky je dána vztahem:

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + e^{\frac{x-x_0}{\Delta x}}} + A_2 \quad (1)$$

kde  $y$  udává poměr hodnot  $I_1/I_3$  v emisním skenu pyrenu,  $A_1$  a  $A_2$  je maximální resp. minimální dosažená hodnota těchto poměrů,  $x$  odpovídá koncentraci fosfolipidu,  $\Delta x$  je gradient a  $x_0$  je inflexní bod. [30]



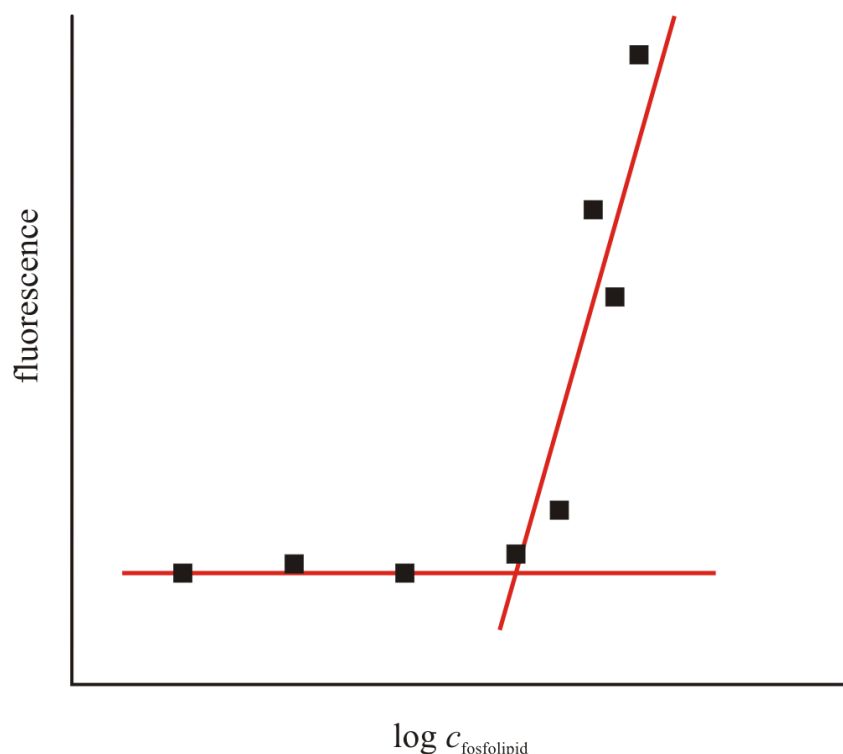


**Obr. 20:** Klesající Boltzmannova křivka a její charakteristické parametry

### 3.2.2.2 Perylen

Perylen má velmi nízkou rozpustnost ve vodě a řadí se tedy mezi hydrofobní sondy. Tato sonda je schopna se rozpustit uvnitř hydrofobní části agregátu a díky tomu pak narůstá intenzita fluorescence. Je-li tedy perylen přítomen v polárním prostředí, které neobsahuje agregáty, nebude detekována žádná fluorescence. Jakmile se však v tomto prostředí začnou agregáty tvořit, dojde k asociaci sondy s hydrofobní oblastí agregátu a intenzita fluorescence začne narůstat.

Na **Obr. 21** je typický průběh popisující změny v intenzitě fluorescence při použití perylenu v závislosti na různé koncentraci amfifilních molekul schopných tvořit micely a také je zde znázorněno vyhodnocování naměřených dat. Při koncentracích, kde se nevyskytují agregáty, není perylen v roztoku rozpuštěn a intenzita jeho fluorescence je velmi nízká a konstantní až do okamžiku, kdy dojde k tvorbě agregátů. To se projeví prudkým nárůstem intenzity fluorescence díky rozpuštění perylenu v hydrofobních doménách. Vyhodnocení spočívá v proložení konstantní a lineární části přímkami a určení jejich průsečíku, který odpovídá hodnotě koncentrace, při níž dochází k tvorbě prvních agregátů.



**Obr. 21:** Závislost intenzity fluorescence na  $\log c$

Fluorescenční emisní skeny byly měřeny pomocí fluorimetru AMINCO Bowman Series 2. Při měření vzorků obsahujících perylen byl monochromátor excitace nastaven na 410 nm a monochromátor emise na 440 nm. Měření byla prováděna při teplotě 20 °C. Měření byly emisní skeny v rozsahu od 430 nm do 600 nm, při rychlosti skenu 5 nm.s<sup>-1</sup>. K určení koncentrace odpovídající počátku agregace byl použit totální integrál emisního spektra v daném rozsahu.

### 3.2.3 Korekce

Jelikož se emisní záření měří v kolmém směru k excitačnímu záření, dochází při tomto uspořádání k detekci emitované fluorescence pouze ze střední části excitačního paprsku dopadajícího na kyvetu se vzorkem. Je-li koncentrace vzorku v roztoku dostatečně nízká, světlo procházející do středu kyvety je jen nepatrně zeslabeno, avšak v případě vysoké koncentrace je významná část dopadajícího světla absorbována dříve než dosáhne středu kyvety. Což vede k tomu, že se zvyšující se koncentrací nejprve intenzita fluorescence roste, poté dosáhne maxima a nakonec klesá. Jev, jenž může takto snížit intenzitu excitačního záření či naměřené fluorescence a tím zkreslit přesnost měření, se nazývá vnitřní filtrační efekt. Proto byla fluorescenční spektra korigována dle vztahu:

$$F_{kor} = F_{obs} \cdot 10^{0,5 \cdot (OD_{ex} + OD_{em})} \quad (2)$$

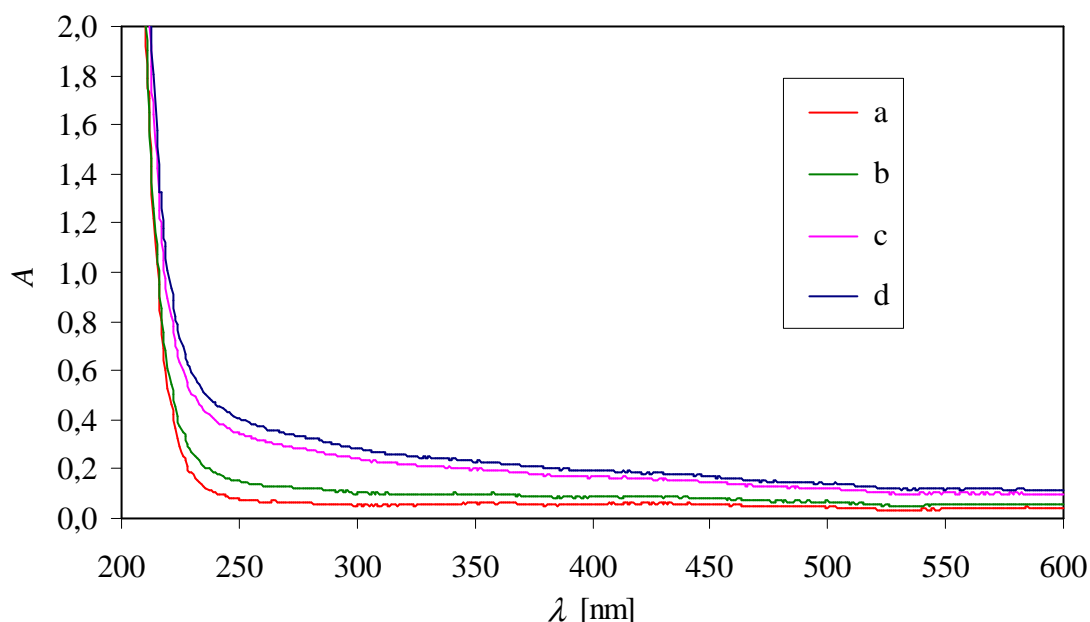
kde  $F_{kor}$  značí korigovanou intenzitu fluorescence,  $F_{obs}$  je intenzita fluorescence, kterou naměříme na přístroji a  $OD_{ex}$  je optická hustota vzorku při excitační a  $OD_{em}$  je optická hustota při emisní vlnové délce.

Korekce vnitřního filtračního efektu a i zákalů u některých vzorků byly provedeny pomocí absorpčního spektrometru Varian Cary Probe 50. U vzorků byly měřeny absorpční spektra v rozsahu od 200 nm do 600 nm s použitím kyvety o optické dráze 1 cm. V tomto případě odpovídá optická hustota vzorku jeho absorbanci a tedy vztah uvedený výše lze přepsat:

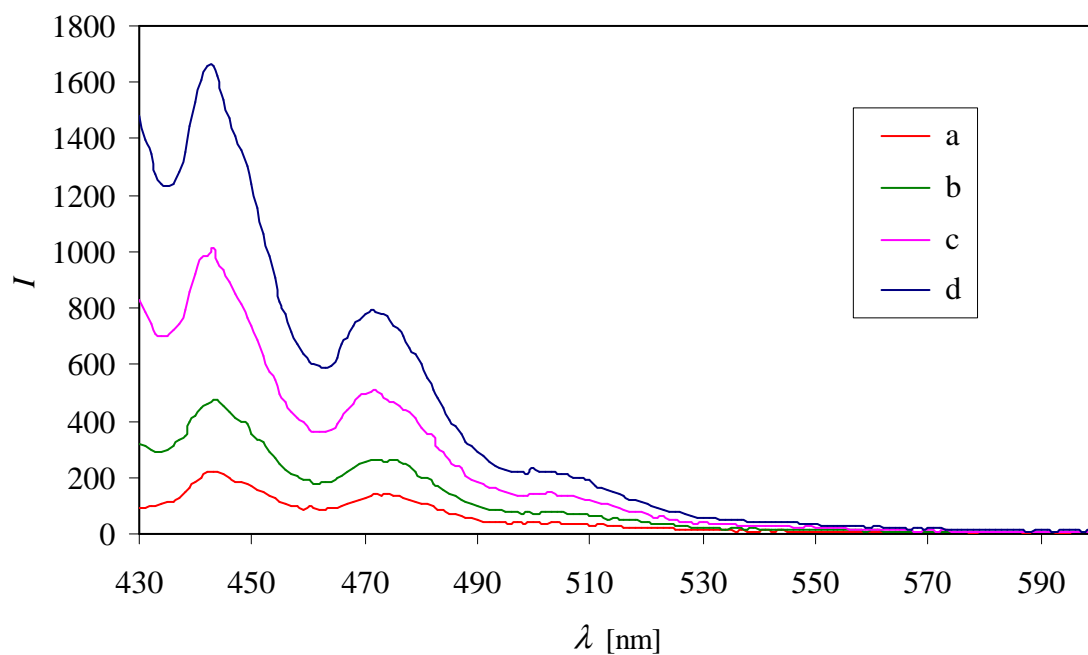
$$F_{kor} = F_{obs} \cdot 10^{0,5 \cdot (A_{ex} + A_{em})} \quad (3)$$

kde  $A_{ex}$  je absorbance při excitační vlnové délce a  $A_{em}$  je absorbance při emisní vlnové délce. [17, 18]

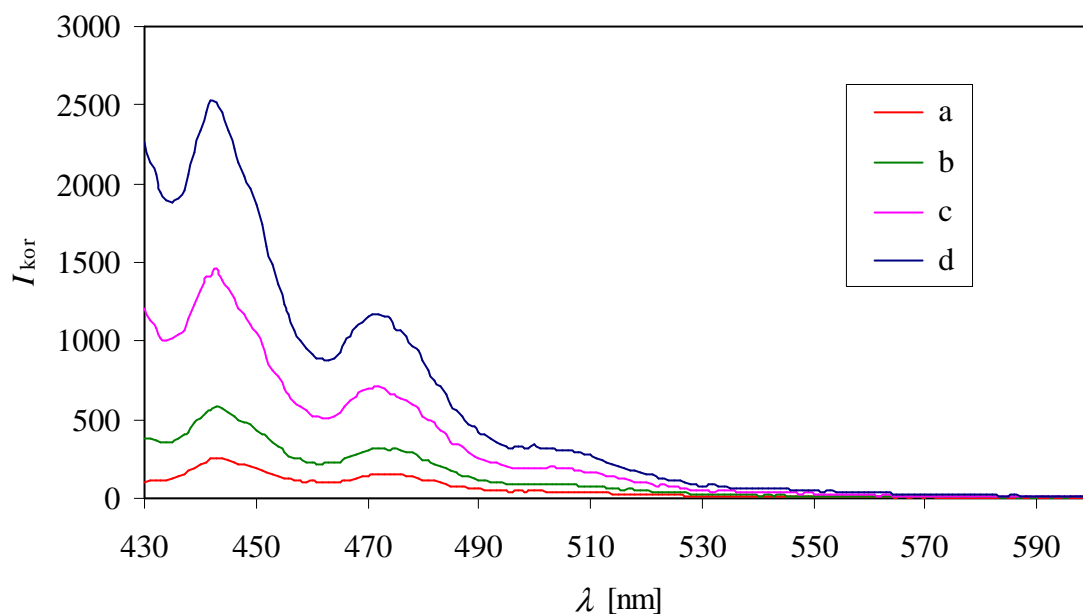
Pro příklad jsou na **Obr. 22** uvedena naměřená absorpční spektra několika vzorků obsahujících 300 kDa HA  $1 \text{ g.dm}^{-3}$  a proměnnou koncentraci DPPC. Na **Obr. 23** jsou znázorněna fluorescenční nekorigovaná spektra vybraných vzorků a **Obr. 24** zobrazuje tyto spektra po korekci.



**Obr. 22:** Naměřená absorpční spektra pro vzorky obsahující 300 kDa HA  $1 \text{ g.dm}^{-3}$  a proměnnou koncentraci DPPC  
(a –  $0,006 \text{ g.dm}^{-3}$ , b –  $0,02 \text{ g.dm}^{-3}$ , c –  $0,06 \text{ g.dm}^{-3}$ , d –  $0,1 \text{ g.dm}^{-3}$ )



**Obr. 23:** Naměřená fluorescenční nekorigovaná spektra pro vzorky obsahující 300 kDa HA  $1 \text{ g.dm}^{-3}$  a proměnnou koncentraci DPPC ( $a - 0,006 \text{ g.dm}^{-3}$ ,  $b - 0,02 \text{ g.dm}^{-3}$ ,  $c - 0,06 \text{ g.dm}^{-3}$ ,  $d - 0,1 \text{ g.dm}^{-3}$ )



**Obr. 24:** Korigovaná fluorescenční spektra pro vzorky obsahující 300 kDa HA  $1 \text{ g.dm}^{-3}$  a proměnnou koncentraci DPPC ( $a - 0,006 \text{ g.dm}^{-3}$ ,  $b - 0,02 \text{ g.dm}^{-3}$ ,  $c - 0,06 \text{ g.dm}^{-3}$ ,  $d - 0,1 \text{ g.dm}^{-3}$ )

## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

V této části diplomové práce bylo zkoumáno nejprve agregační chování samotných fosfolipidů ve vodě a poté v přítomnosti hyaluronanu. Zvolenými fosfolipidy byly lecitin a DPPC. Lecitin jako významný představitel povrchově aktivních látek nachází již od starověku široké uplatnění. Každodenně se využívá v řadě oblastí zahrnujících potravinářský, živočišný, kosmetický, farmaceutický a výrobní průmysl. Lecitin je tvořen směsí fosfolipidů. DPPC, jakožto majoritní složka lecitinu, byl vybrán jako další fosfolipid pro sledování agregačního chování.

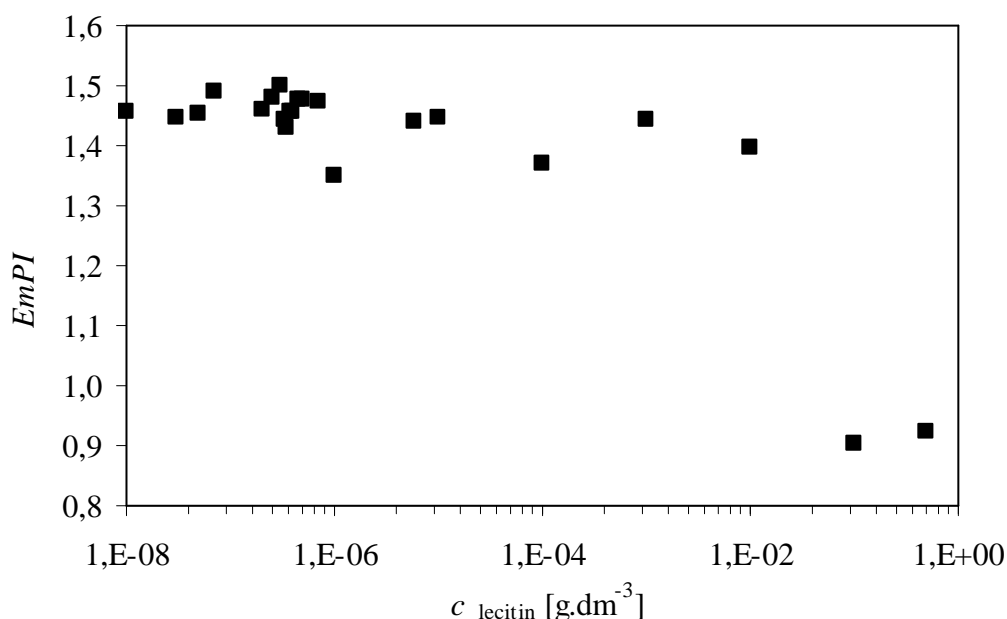
### 4.1 Lecitin

Bylo zjišťováno agregační chování lecitinu ve vodě a poté v přítomnosti hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti a koncentraci. Zvolenou fluorescenční sondou byl pyren.

#### 4.1.1 Stanovení kritické agregační koncentrace lecitinu ve vodě

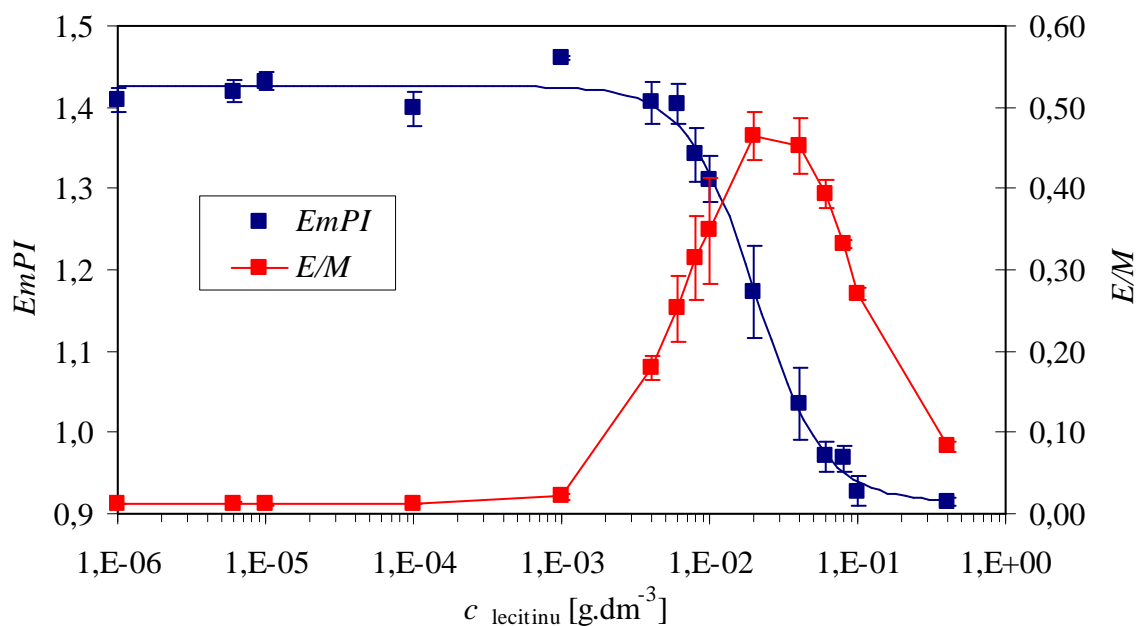
Pro určení koncentrace odpovídající počátku agregace a kritické agregační koncentrace (CAC) lecitinu ve vodě byla nejprve proměřena široká koncentrační řada lecitinu ve vodě, u které byly zohledněny publikované hodnoty kritické agregační koncentrace lecitinu a DPPC (jakožto majoritní složky lecitinu) ve vodě. U lecitinu byla podle **Wu a Wang** stanovena CAC na  $13,6 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  [32] a **Palacios a Wang** určili tuto hodnotu na  $15,3 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  [33]. V literatuře byly pro kritickou agregační koncentraci DPPC ve vodě nalezeny dvě rozdílné hodnoty. První publikovaná hodnota CAC DPPC ve vodě byla  $3,4 \cdot 10^{-7} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [34, 35, 36], ale podle **Wu a Wang** byla tato hodnota stanovena na  $2,67 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  [32].

Zmíněná koncentrační řada lecitinu ve vodě byla navržena v rozmezí koncentrací od  $10^{-8} \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  po  $0,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (**Obr. 25**). Větší četnost bodů odpovídající koncentraci řádově stovkám  $\text{ng} \cdot \text{dm}^{-3}$  byla zvolena pro potvrzení, či vyloučení nižší publikované hodnoty kritické agregační koncentrace. Ze závislosti emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci lecitinu byla stanovena přibližná hodnota CAC lecitinu ve vodě. Tato přibližná hodnota CAC se nachází řádově v desítkách  $\text{mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , což odpovídá hodnotám stanoveným **Wu a Wangem** a **Palaciosem a Wangem** [32, 33].



**Obr. 25:** Závislost emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci lecitinu ve vodě

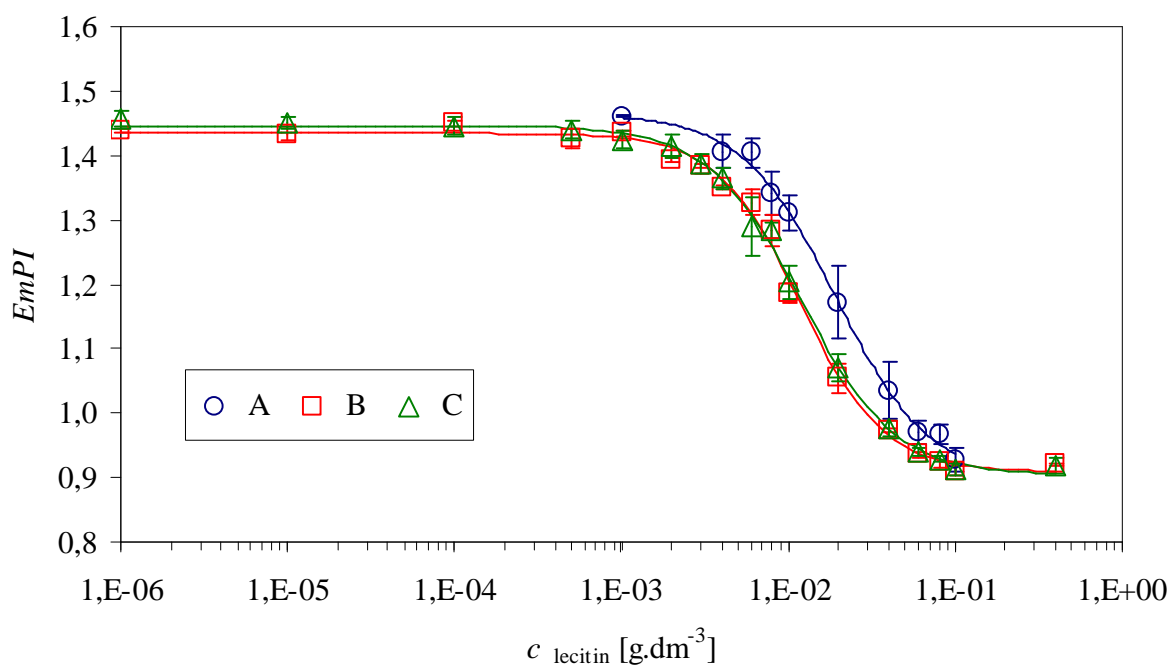
Podle přibližné hodnoty CAC (viz. **Obr. 25**) byla namíchána další již užší koncentrační řada, která sloužila k upřesnění výsledků. Závislost poměru emisního polaritního indexu pyrenu ( $EmPI$ ) a také závislost poměru emisního pásu excimeru ku emisnímu pásu monomeru pyrenu ( $E/M$ ) na koncentraci lecitinu je zobrazena na **Obr. 26**. Ze získané závislosti  $EmPI$  na koncentraci lecitinu lze určit počátek agregace a kritickou agregační koncentraci. Počátek agregace byl stanoven na  $5,6 \pm 1,0 \text{ mg.dm}^{-3}$ . Hodnota kritické agregační koncentrace lecitinu ve vodě je  $19,7 \pm 4,1 \text{ mg.dm}^{-3}$  a řádově se shoduje s hodnotami stanovenými **Wu a Wangem** a **Palaciosem a Wangem**. [32, 33]. Z grafu je také patrné, že při koncentraci  $1,0 \text{ mg.dm}^{-3}$  lecitinu ve vodě dochází k nárůstu poměru  $E/M$  a tato hodnota se řádově shoduje s počátkem agregace zjištěným při použití závislosti  $EmPI$  na koncentraci lecitinu ve vodě. Maximum závislosti  $E/M$  na koncentraci lecitinu lze vysvětlit tím, že při nízké koncentraci agregátů v roztoku může být přítomnost pásu excimeru v naměřených fluorescenčních spektrech způsobena lokálním zakoncentrováním molekul pyrenu v hydrofobních doménách. S narůstající koncentrací agregátů v roztoku excimer zaniká, jelikož dochází k rovnoměrnějšímu rozdělení molekul pyrenu v systému. Maximum závislosti  $E/M$  odpovídá inflexnímu bodu závislosti  $EmPI$  na koncentraci lecitinu a oba tyto ukazatele charakterizují kritickou agregační koncentraci.



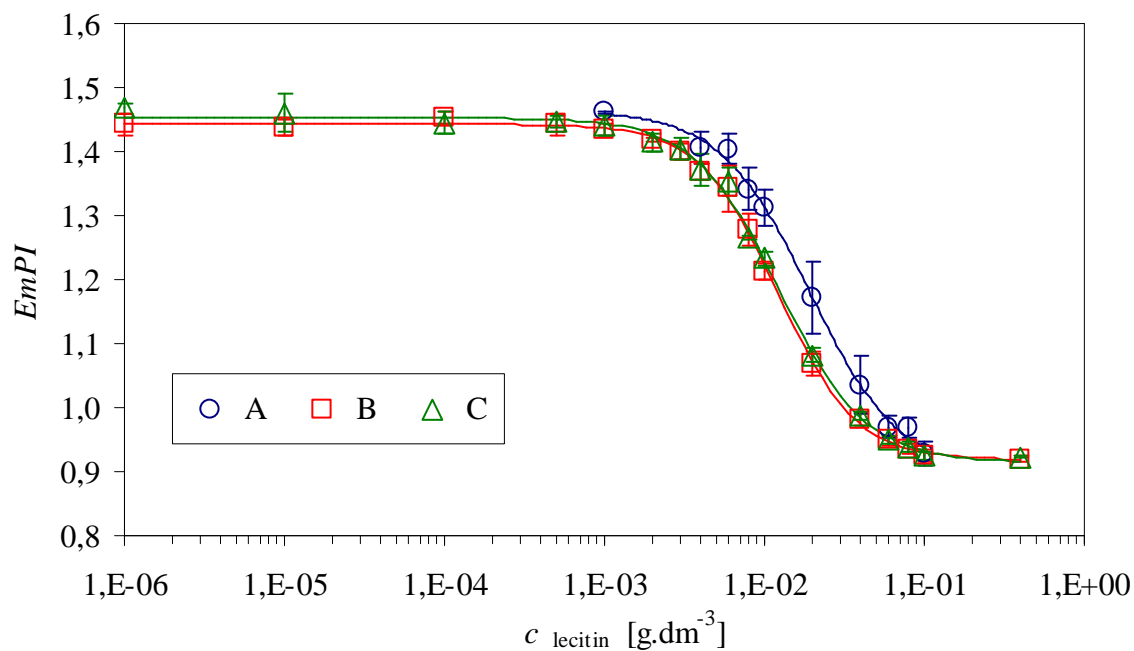
**Obr. 26:** Srovnání koncentračních závislostí emisního polaritního indexu a  $E/M$  lecitinu ve vodě

#### 4.1.2 Sledování agregačního chování lecitinu v přítomnosti nativního hyaluronanu

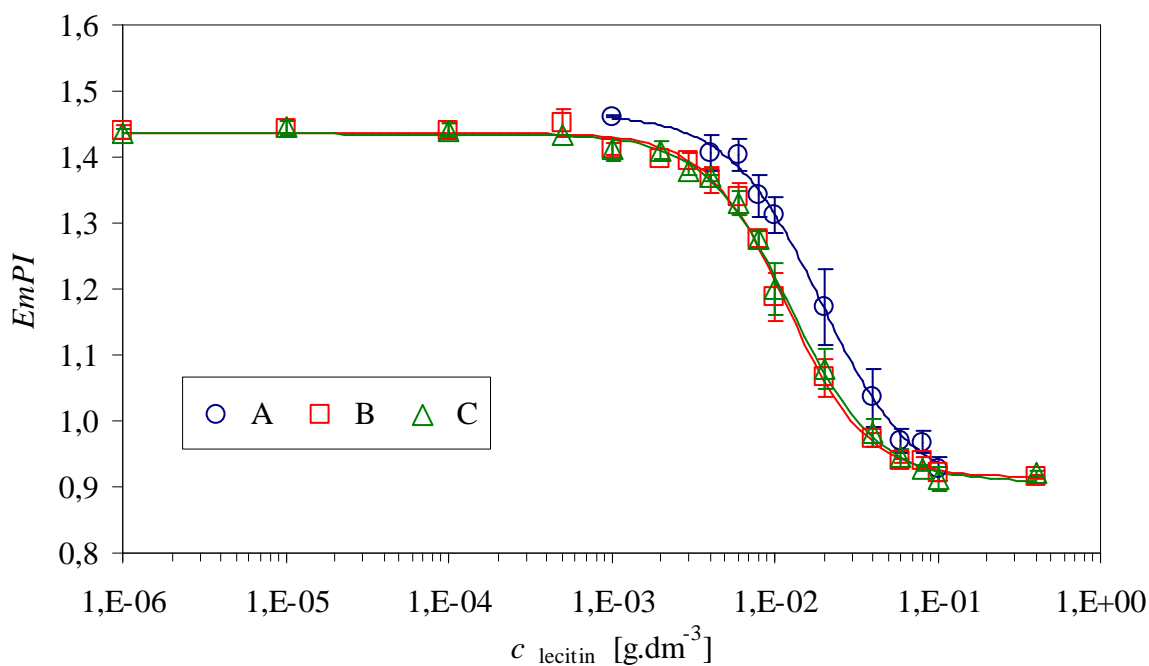
Byl zkoumán vliv nativního hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech (73 kDa, 300 kDa a 1,46 MDa) a koncentracích ( $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) na agregační chování lecitinu.



**Obr. 27:** Závislost emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci lecitinu v přítomnosti HA 73 kDa (A – lecitin bez HA, B – lecitin +  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  HA, C – lecitin +  $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  HA)



**Obr. 28:** Závislost emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci lecitinu v přítomnosti HA 300 kDa (A – lecitin bez HA, B – lecitin + 1 g.dm<sup>-3</sup> HA, C – lecitin + 15 mg.dm<sup>-3</sup> HA)



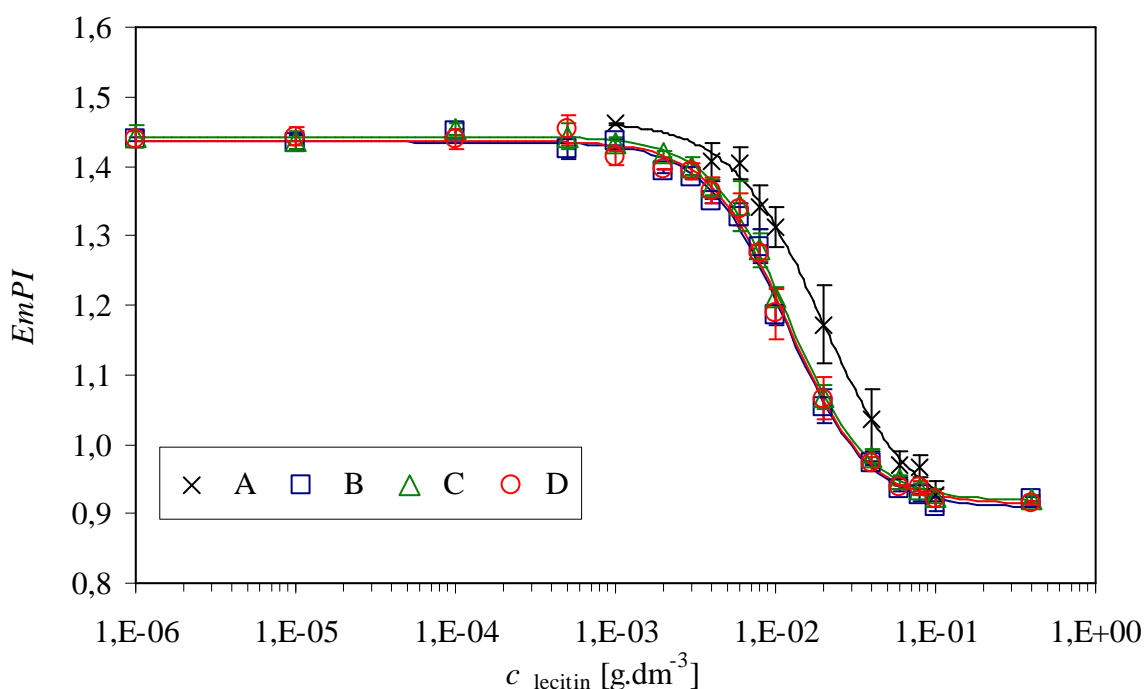
**Obr. 29:** Závislost emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci lecitinu v přítomnosti HA 1,46 MDa (A – lecitin bez HA, B – lecitin + 1 g.dm<sup>-3</sup> HA, C – lecitin + 15 mg.dm<sup>-3</sup> HA)



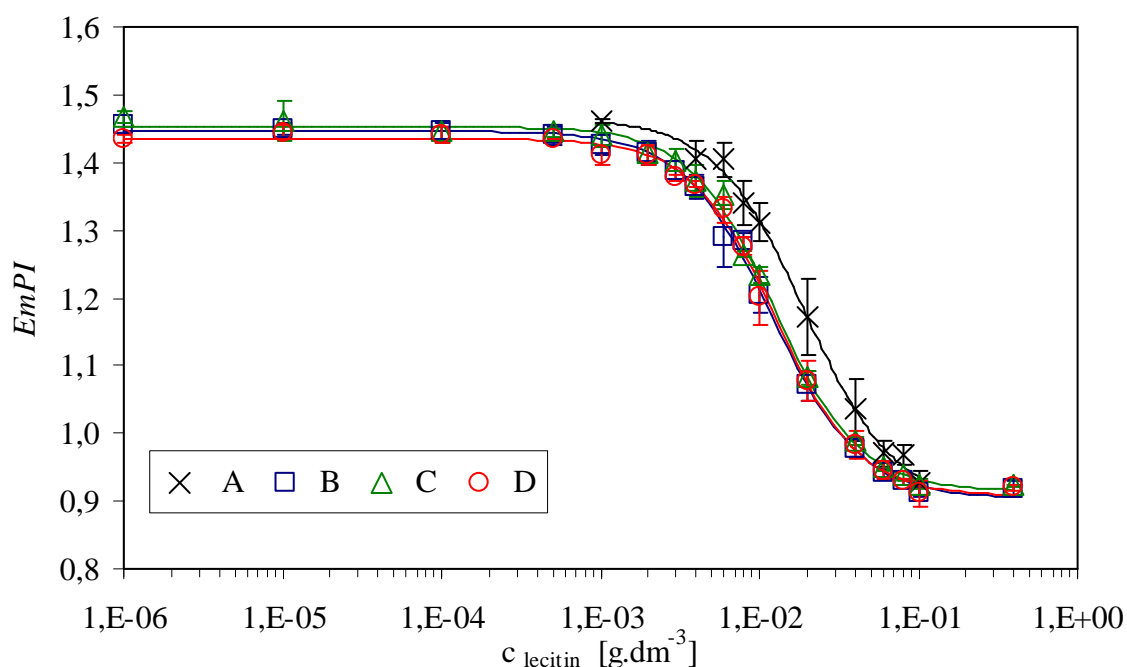
Na **Obr. 27** jsou znázorněny závislosti poměru  $I_1/I_3$  emisních maxim pyrenu na koncentraci lecitinu a to pro lecitin ve vodě a dále pro tento systém s přidavkem 73 kDa HA o koncentraci  $1 \text{ g.dm}^{-3}$  a  $15 \text{ mg.dm}^{-3}$ . Jak je patrné z uvedených závislostí, přítomnost hyaluronanu má pouze malý vliv na kritickou micelární koncentraci lecitinu a to bez ohledu na koncentraci použitého hyaluronanu.

Stejný systém, avšak s tím rozdílem, že místo 73 kDa HA byl použit hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa, je zobrazen na **Obr. 28**. Z daných závislostí je zřejmé, že vzorky obsahující 300 kDa HA zcela nepatrně snižují CAC lecitinu. Obě křivky vzorků s hyaluronanem mají stejný tvar i průběh a vychází pro ně prakticky stejná CAC.

Ze závislosti polaritního indexu na koncentraci lecitinu s použitím vysokomolekulární HA (1,46 MDa) vyplývá, že po přidání hyaluronanu dochází jen k malému poklesu CAC lecitinu (viz. **Obr. 29**).



**Obr. 30:** Závislost emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci lecitinu – porovnání  
přídavku HA o koncentraci  $1 \text{ g.dm}^{-3}$  a různé molekulové hmotnosti  
(A – lecitin bez HA, B – lecitin + HA 73 kDa, C – lecitin + HA 300 kDa, D – lecitin + HA  
1,46 MDa)



**Obr. 31:** Závislost emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci lecitinu – porovnání  
přídavku HA o koncentraci  $15 \text{ mg.dm}^{-3}$  a různé molekulové hmotnosti  
(A – lecitin bez HA, B – + HA 73 kDa, C – lecitin + HA 300 kDa, D – lecitin + HA  
1,46 MDa)

Při porovnání závislostí poměrů  $I_1/I_3$  emisních maxim pyrenu na koncentraci lecitinu a to pro lecitin ve vodě a dále pro tento systém s přídavkem hyaluronanu o koncentraci  $1 \text{ g.dm}^{-3}$  ale o různých molekulových hmotnostech (**Obr. 30**) vyplývá, že přítomnost hyaluronanu pouze mírně snižuje CAC lecitinu, avšak rozdílné molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu nemají vliv na průběh a tvar křivek. To samé platí i při srovnání závislostí vzorků, které obsahují hyaluronan o koncentraci  $15 \text{ mg.dm}^{-3}$  a rozdílných molekulových hmotnostech (**Obr. 31**).

Z naměřených hodnot kritických agregačních koncentrací lecitinu bez přídavku hyaluronanu a v přítomnosti nativního hyaluronanu o vybraných molekulových hmotnostech a koncentracích (**Tab. 1**) vyplývá, že po přídavku hyaluronanu dochází u kritické agregační koncentrace lecitinu k jejímu mírnému snížení a tedy přítomnost hyaluronanu daný systém ovlivňuje. U systémů obsahujících hyaluronan se hodnoty CAC pro zvolené molekulové hmotnosti a koncentrace shodují, což by znamenalo, že molekulová hmotnost a koncentrace hyaluronanu nemají na hodnotu CAC žádný vliv.

**Tab. 1:** Shrnutí naměřených CAC pro lecitin

	CAC (mg.dm <sup>-3</sup> )
bez HA	19,7 ± 4,1
73 kDa HA 1 g.dm <sup>-3</sup>	11,8 ± 1,1
73 kDa HA 15 mg.dm <sup>-3</sup>	12,0 ± 1,3
300 kDa HA 1 g.dm <sup>-3</sup>	12,1 ± 0,8
300 kDa HA 15 mg.dm <sup>-3</sup>	12,3 ± 0,6
1,46 MDa HA 1 g.dm <sup>-3</sup>	11,9 ± 1,4
1,46 MDa HA 15 mg.dm <sup>-3</sup>	12,8 ± 1,8

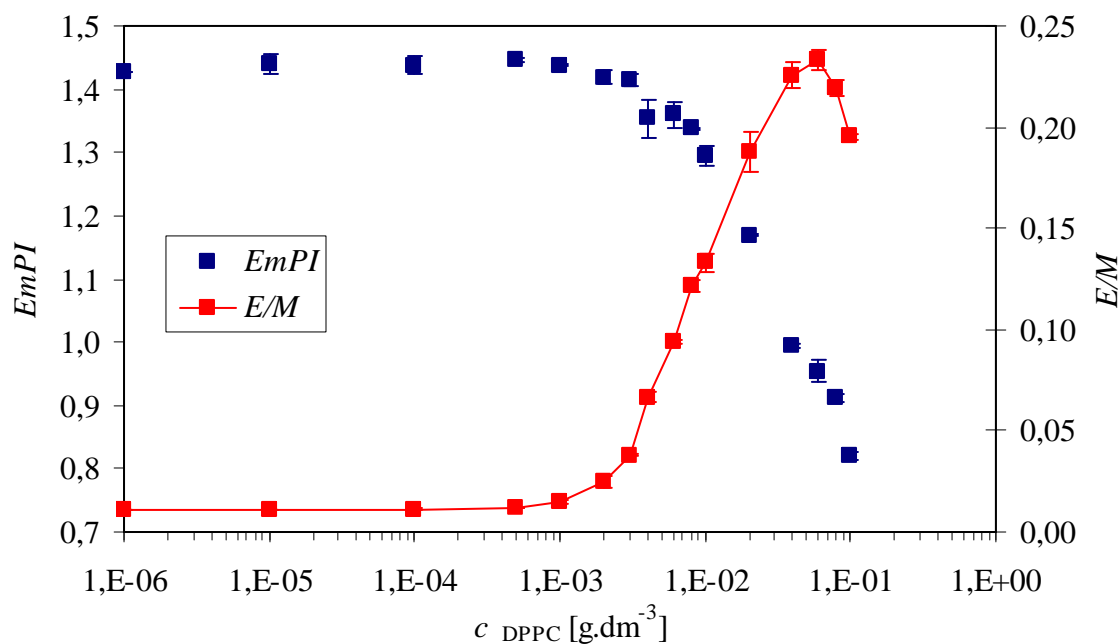
## 4.2 DPPC

Obdobně jako pro lecitin bylo sledováno agregační chování nejdříve samotného DPPC ve vodě a poté DPPC v přítomnosti hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti a koncentraci. V průběhu práce s DPPC se vyskytl při interpretaci dat získaných z emisních spekter pyrenu problém. Vzorčky o vysoké koncentraci DPPC byly velmi zakalené a ani korekce či kompenzace blankem neumožnily získat data, která by měla charakter Boltzmannovy křivky.

K vyhodnocení těchto dat byly proto kromě závislosti emisního polaritního indexu pyrenu použity závislosti poměru emisního pásu excimeru ku emisnímu pásu monomeru pyrenu a také byla zvolena další fluorescenční sonda – perylen.

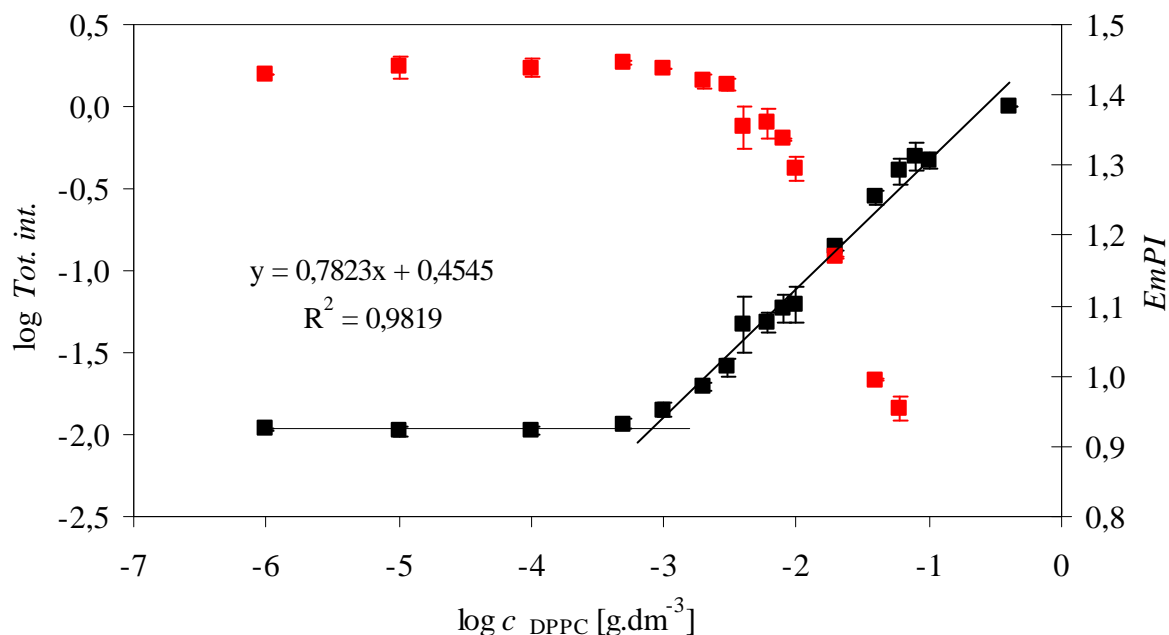
### 4.2.1 Stanovení kritické agregační koncentrace DPPC ve vodě

Závislosti emisního polaritního indexu pyrenu a poměru emisního pásu excimeru ku emisnímu pásu monomeru pyrenu na koncentraci DPPC ve vodě jsou zobrazeny na **Obr. 32**. Závislost emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci DPPC ve vodě nevykazovala sigmoidní tvar Boltzmannovy křivky, jež je potřebný pro matematické vyhodnocení této naměřené závislosti a nelze tedy určit přesnou hodnotu CAC. Z této závislosti je však patrné, že počátek agregace nastává v prvním zlomu a je potvrzen nárůstem poměru  $E/M$ .



**Obr. 32:** Srovnání koncentračních závislostí emisního polaritního indexu a  $E/M$  pro DPPC ve vodě

Na **Obr. 33** jsou porovnávány průběhy závislostí logaritmu normovaného totálního integrálu fluorescence z emisního spektra perylenu (*Tot. int.*) a emisního polaritního indexu pyrenu na logaritmu koncentrace DPPC ve vodě. Ze závislostí je zřejmé, že zlomy na křivkách si jak pro pyren tak pro perylen řádově odpovídají a tudíž lze ze závislosti logaritmu *Tot. int.* perylenu na logaritmu koncentrace DPPC ve vodě matematicky vyhodnotit koncentraci odpovídající počátku agregace. Ze zmíněných závislostí nelze stanovit kritickou agregační koncentraci a z tohoto důvodu bude sledovaným parametrem agregačního chování DPPC ve vodě počátek agregace. Vyhodnocením závislosti logaritmu *Tot. int.* perylenu na logaritmu koncentrace DPPC ve vodě byl určen počátek agregace DPPC ve vodě na  $0,8 \pm 0,1 \text{ mg.dm}^{-3}$ .



**Obr. 33:** Srovnání koncentračních závislostí logaritmu totálního integrálu fluorescence z emisního spektra perylenu (Tot. int.) a emisního polaritního indexu pyrenu (EmPI) pro DPPC ve vodě

#### 4.2.2 Sledování agregačního chování DPPC v přítomnosti nativního hyaluronanu

V této části byl zkoumán vliv přídavku nativního hyaluronanu o molekulové hmotnosti 73 kDa, 300 kDa a 1,46 MDa a koncentraci  $1 \text{ g.dm}^{-3}$  a  $15 \text{ mg.dm}^{-3}$  na agregační chování DPPC.

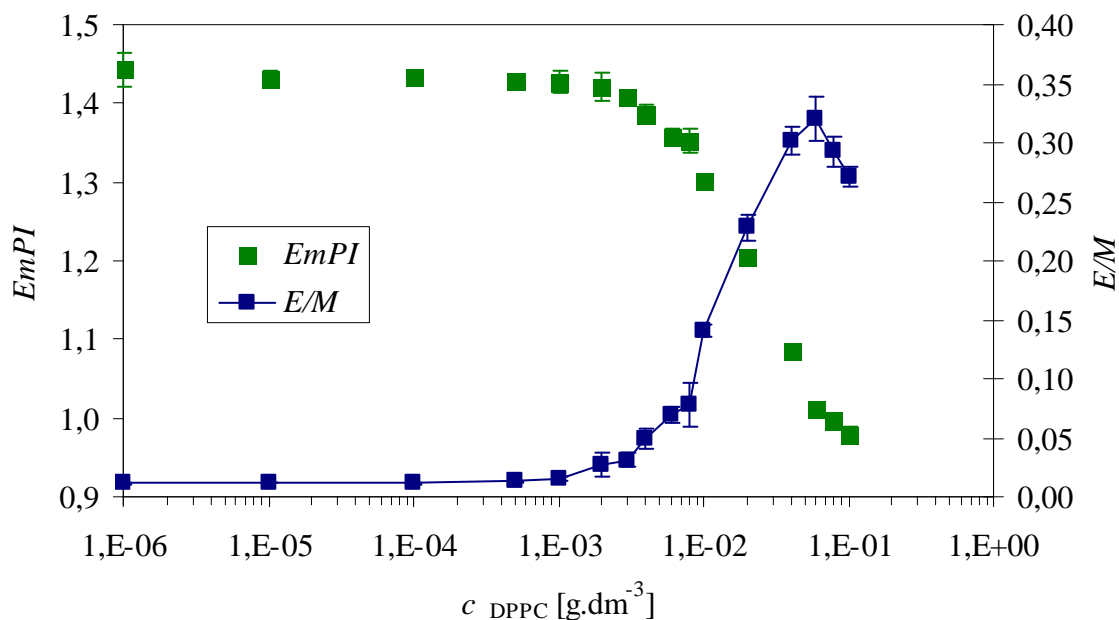
##### 4.2.2.1 Porovnání parametrů pyrenových dat

Pro ukázkou byly vybrány dva systémy, u kterých budou porovnávány parametry pyrenových dat. Tyto charakteristiky pro systém obsahující HA 73 kDa HA o koncentraci  $15 \text{ mg.dm}^{-3}$  jsou uvedeny na **Obr. 34**. Na **Obr. 35** jsou znázorněny charakteristiky druhého systému, ve kterém byl použit vysokomolekulární hyaluronan (1,46 MDa) opět o koncentraci  $15 \text{ mg.dm}^{-3}$ .

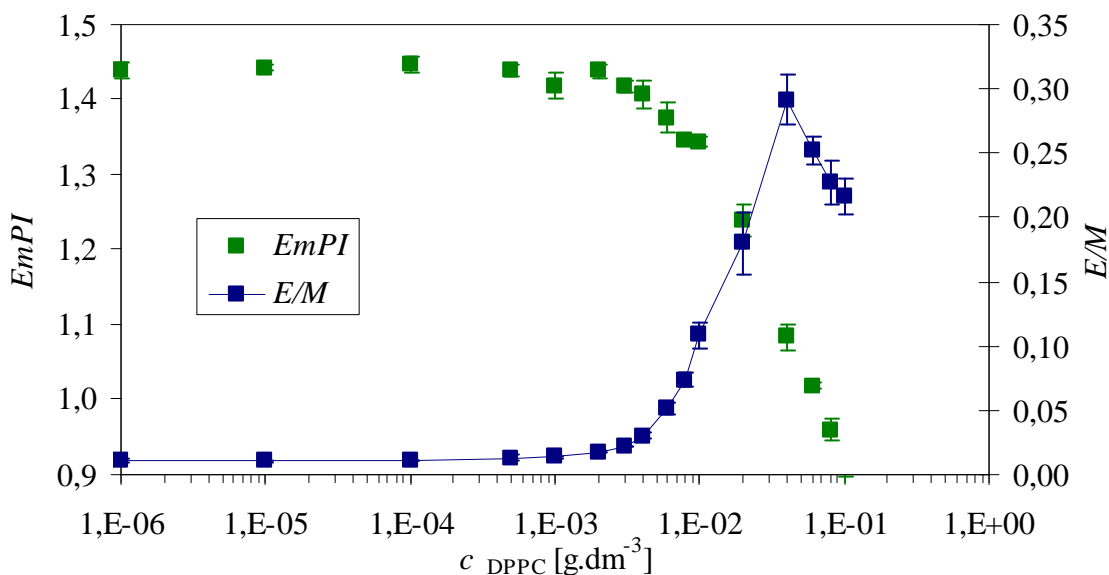
Na obou těchto grafech nemá závislost emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci DPPC v přítomnosti zmíněné HA charakteristický sigmoidní tvar Boltzmannovy křivky. Stejný průběh vykazovala závislost  $EmPI$  pyrenu na koncentraci DPPC ve vodě – viz. kapitola 4.2.1. I pro tyto vybrané systémy nelze ze získaných závislostí matematicky vyhodnotit kritické agregační koncentrace DPPC v přítomnosti zvoleného hyaluronanu. Rovněž je z těchto dvou závislostí zřejmé, že počátek agregace nastává v prvním zlomu a je potvrzen nárůstem poměru  $E/M$ .

Ze závislostí poměrů emisního pásu excimeru ku emisnímu pásu monomeru pyrenu na koncentraci DPPC v přítomnosti zvolené HA je patrné, že maximum poměru  $E/M$  neodpovídá předpokládanému inflexnímu bodu. Maximum poměru  $E/M$  je u těchto závislostí posunuto, čímž se systém obsahující DPPC liší od systému složeného z lecitinu, ve kterém maximum

poměru  $E/M$  odpovídalo inflexnímu bodu. Tento trend je charakteristický pro všechny systémy obsahující jak DPPC ve vodě tak i DPPC v přítomnosti hyaluronanu o molekulové hmotnosti 73 kDa, 300 kDa a 1,46 MDa a koncentraci  $1 \text{ g.dm}^{-3}$  a  $15 \text{ mg.dm}^{-3}$ .



**Obr. 34:** Srovnání koncentračních závislostí emisního polaritního indexu a  $E/M$  pro DPPC v přítomnosti 73 kDa HA o koncentraci  $15 \text{ mg.dm}^{-3}$

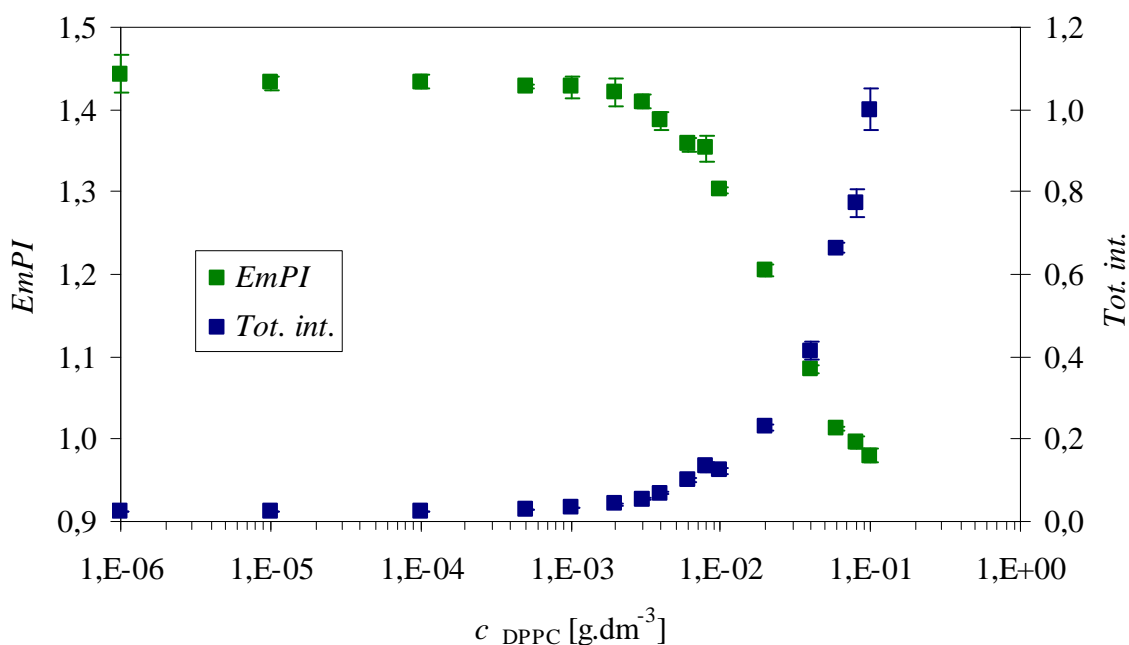


**Obr. 35:** Srovnání koncentračních závislostí emisního polaritního indexu a  $E/M$  pro DPPC v přítomnosti 1,46 MDa HA o koncentraci  $15 \text{ mg.dm}^{-3}$

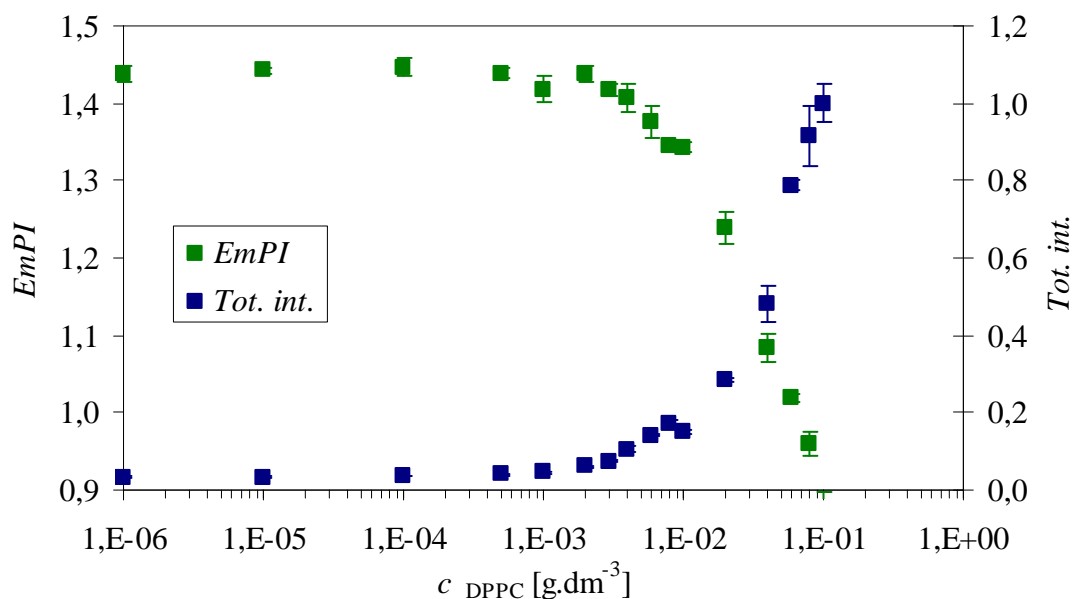
#### 4.2.2.2 Porovnání pyren - perylen

Opět byly vybrány dva systémy, u nichž budou diskutovány průběhy dvou různých závislostí a to totálního integrálu emisního spektra perylenu na koncentraci DPPC v přítomnosti zvolené HA a emisního polaritního indexu pyrenu na koncentraci DPPC v přítomnosti stejné HA. Tyto závislosti jsou pro systém obsahující HA 73 kDa HA o koncentraci  $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  uvedeny na **Obr. 36**. Na **Obr. 37** jsou znázorněny závislosti druhého systému, ve kterém byl použit vysokomolekulární hyaluronan ( $1,46 \text{ MDa}$ ) opět o koncentraci  $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Z obou grafů je zřejmé, že zlomy, při nichž se v roztoku začínají formovat první agregáty, si na křivkách jak pro pyren tak pro perylen řádově odpovídají. Tato skutečnost platí pro všechny systémy obsahující jak DPPC ve vodě (viz. kapitola 4.2.2.1), tak i DPPC v přítomnosti hyaluronanu o molekulové hmotnosti 73 kDa, 300 kDa a 1,46 MDa a koncentraci  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Z této zjištěné skutečnosti lze následně pro všechny zmíněné systémy k vyhodnocení počátku agregace použít zlom u perylenových křivek.



**Obr. 36:** Srovnání koncentračních závislostí totálního integrálu fluorescence z emisního spektra perylenu (*Tot. Int.*) a emisního polaritního indexu pyrenu (*EmPI*) pro systém DPPC – 73 kDa HA  $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$



**Obr. 37:** Srovnání koncentračních závislostí totálního integrálu fluorescence z emisního spektra perylenu (Tot. Int.) a emisního polaritního indexu pyrenu (EmPI) pro systém DPPC – 1,46 MDa HA 15 mg.dm<sup>-3</sup>

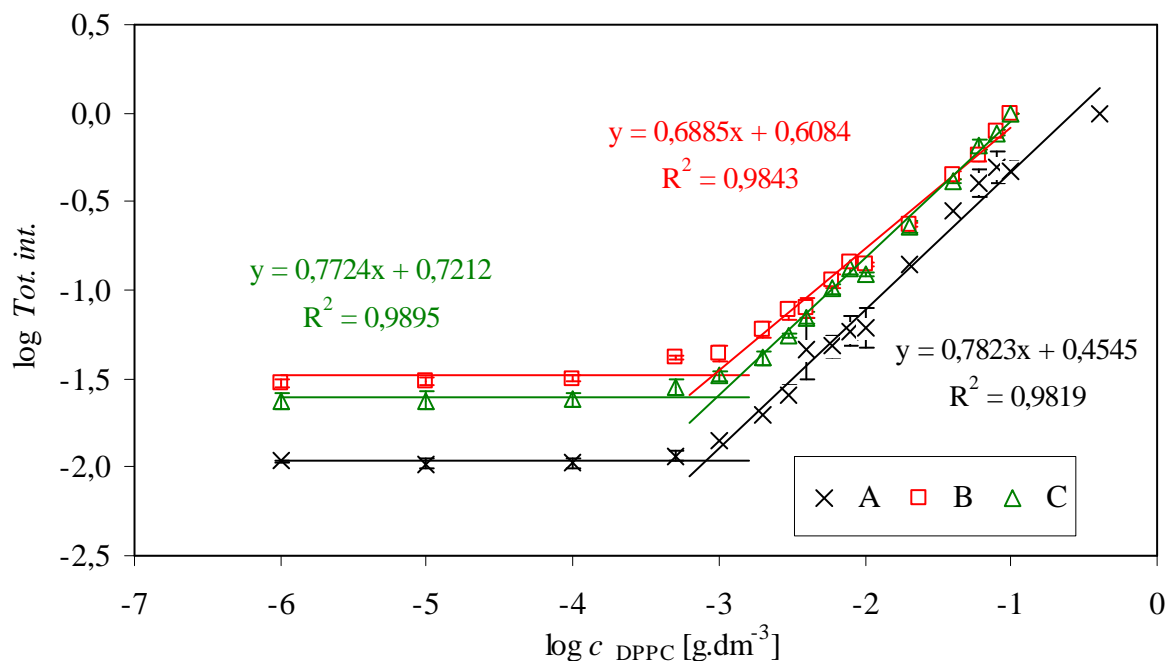
#### 4.2.2.3 Perylen

Pro přesné určení hodnot počátku agregace DPPC v přítomnosti nativního hyaluronanu byly použity logaritmické závislosti normovaných totálních integrálů emisního spektra perylenu na logaritmu koncentrace. Na **Obr. 38** jsou zobrazeny závislosti logaritmu totálního integrálu emisního spektra perylenu na logaritmu koncentrace DPPC ve vodě a v přítomnosti HA 73 kDa o koncentracích 1 g.dm<sup>-3</sup> a 15 mg.dm<sup>-3</sup>. Rozdíly v intenzitách pro jednotlivé křivky při nízkých koncentracích DPPC jsou způsobeny zvoleným logaritmickým měřítkem, které však zajišťuje přehlednost dat v oblasti, kde se na křivkách objevují zlomy. Ve skutečnosti se tyto intenzity liší řádově v setinách. Ze znázorněných závislostí je patrné, že přítomnost hyaluronanu nemá vliv na počátek agregace DPPC a to bez ohledu na koncentraci použitého hyaluronanu.

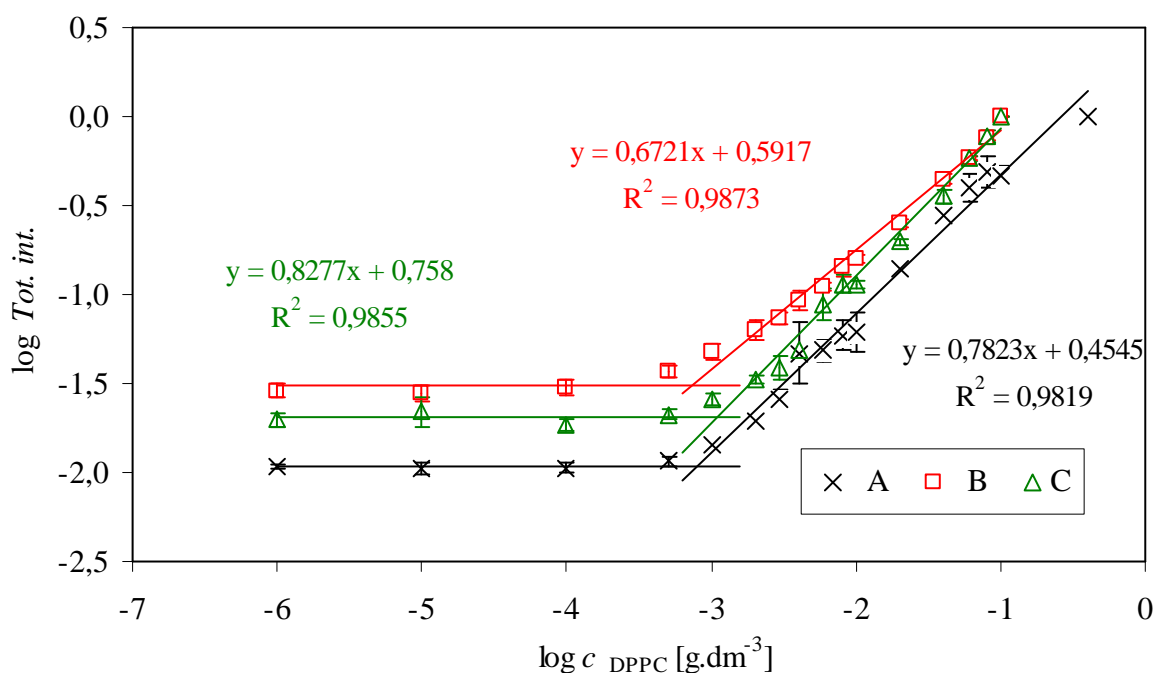
Na **Obr. 39** jsou znázorněny stejné závislosti jen s tím rozdílem, že místo 73 kDa HA byl použit hyaluronan o molekulové hmotnosti 300 kDa. V případě přidání HA o koncentraci 1 g.dm<sup>-3</sup> tento přídavek neovlivňuje počátek agregace DPPC. Ovšem při použití HA o nižší koncentraci 15 mg.dm<sup>-3</sup> dochází k mírnému zvýšení koncentrace odpovídající počátku agregace DPPC, což by naznačovalo, že při použití HA o nižší koncentraci dochází k většímu ovlivnění systému.

Závislosti logaritmu totálního integrálu emisního spektra perylenu na logaritmu koncentrace DPPC ve vodě a s použitím vysokomolekulární HA (1,46 MDa) o koncentraci 1 g.dm<sup>-3</sup> a 15 mg.dm<sup>-3</sup> jsou zobrazeny na **Obr. 40**. Ani zde přídavek hyaluronanu neovlivňuje kritickou agregační koncentraci DPPC.

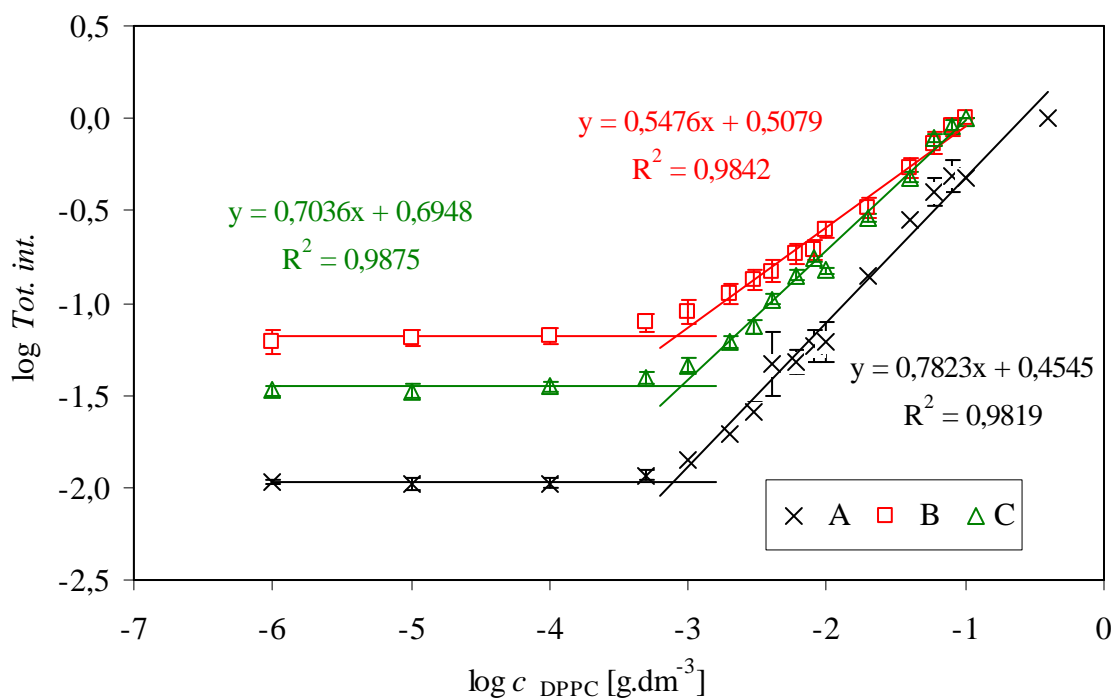




**Obr. 38:** Závislost logaritmu totálního integrálu emisního spektra perylenu na logaritmu koncentrace DPPC v přítomnosti HA 73 kDa (A – lecitin bez HA, B – lecitin + 1 g  $\cdot dm^{-3}$  HA, C – lecitin + 15 mg  $\cdot dm^{-3}$  HA)

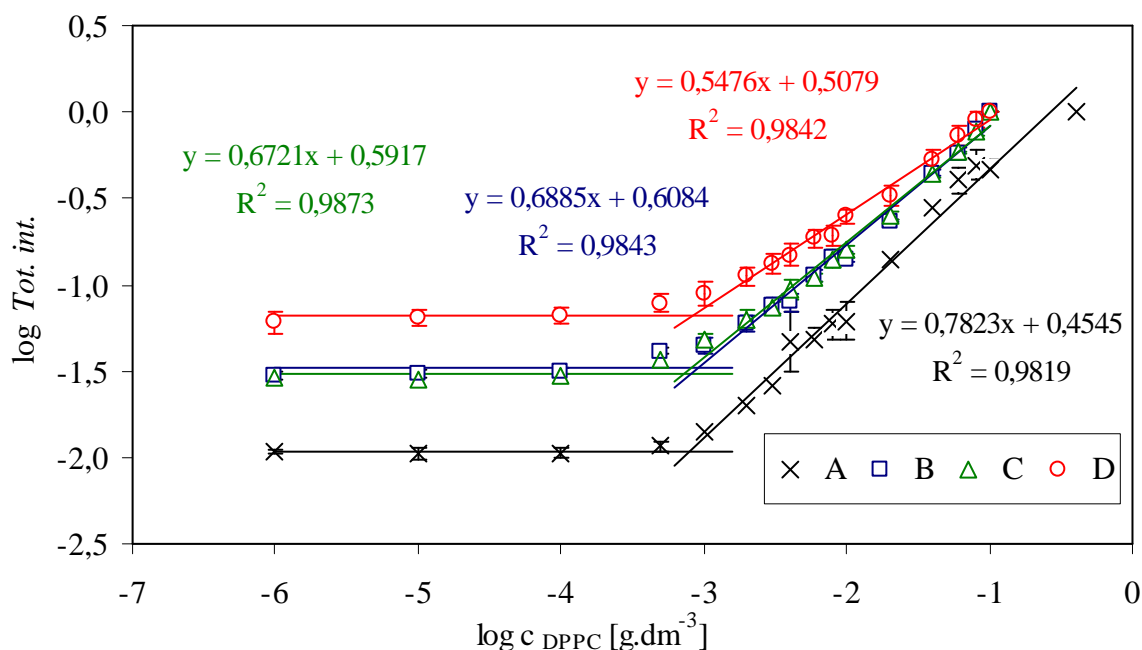


**Obr. 39:** Závislost logaritmu totálního integrálu emisního spektra perylenu na logaritmu koncentrace DPPC v přítomnosti HA 300 kDa (A – lecitin bez HA, B – lecitin + 1 g  $\cdot dm^{-3}$  HA, C – lecitin + 15 mg  $\cdot dm^{-3}$  HA)

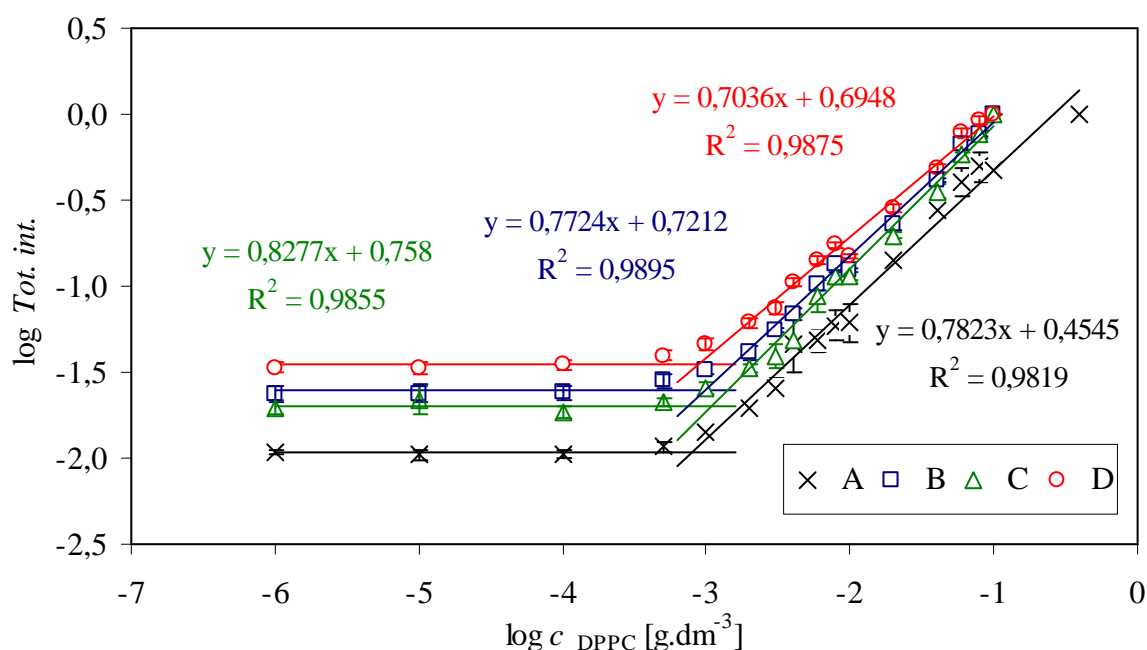


**Obr. 40:** Závislost logaritmu totálního integrálu emisního spektra perylenu na logaritmu koncentrace DPPC v přítomnosti HA 1,46 MDa (A – lecitin bez HA, B – lecitin + 1 g.dm<sup>-3</sup> HA, C – lecitin + 15 mg.dm<sup>-3</sup> HA)

Při porovnání závislostí logaritmu totálního integrálu emisního spektra perylenu na logaritmu koncentrace DPPC a to jak pro DPPC ve vodě tak pro tento systém s přidavkem hyaluronanu o koncentraci 1 g.dm<sup>-3</sup> ale různých molekulových hmotnostech (**Obr. 41**) vyplývá, že přidavek hyaluronanu neovlivňuje kritickou agregační koncentraci DPPC. Zvolené molekulové hmotnosti použitého hyaluronanu nemají vliv na průběh a tvar křivek. To samé platí téměř u všech závislostí, které obsahují hyaluronan o koncentraci 15 mg.dm<sup>-3</sup> a rozdílných molekulových hmotnostech (**Obr. 42**). Pouze již zmíněný přídavek 73 kDa HA o této koncentraci mírně zvyšuje koncentraci odpovídající počátku agregace DPPC.



**Obr. 41:** Závislost logaritmu totálního integrálu emisního spektra perylenu na logaritmu koncentrace DPPC – porovnání přidavku HA o koncentraci  $1 \text{ g.dm}^{-3}$  a různé molekulové hmotnosti (A – lecitin bez HA, B – lecitin + HA 73 kDa, C – lecitin + HA 300 kDa, D – lecitin + HA 1,46 MDa)



**Obr. 42:** Závislost logaritmu totálního integrálu emisního spektra perylenu na logaritmu koncentrace DPPC – porovnání přidavku HA o koncentraci  $15 \text{ mg.dm}^{-3}$  a různé molekulové hmotnosti (A – lecitin bez HA, B – + HA 73 kDa, C – lecitin + HA 300 kDa, D – lecitin + HA 1,46 MDa)

### 4.3 Porovnání počátků agregace lecitinu a DPPC

Pro srovnání agregačního chování nejprve samotného lecitinu a DPPC ve vodě a následně v přítomnosti hyaluronanu byly využity hodnoty odpovídající počátkům agregace daných fosfolipidů. V případě lecitinu bylo možno kromě počátku agregace stanovit i kritickou agregační koncentraci, jelikož naměřená data pro lecitin mohla být vyhodnocena na základě proložení získaných závislostí Boltzmannovou křivkou. Avšak u DPPC toto proložení možné nebylo, protože vzorky o vysoké koncentraci DPPC byly velmi zakalené a ani korekce či kompenzace blankem neumožnily získat data, která by měla charakter Boltzmannovy křivky. Z toho důvodu byly pro porovnání fosfolipidů zvoleny koncentrace odpovídající počátku agregace.

**Tab. 2:** Shrnutí naměřených počátků agregace

	Počátek agregace (mg.dm <sup>-3</sup> ) fosfolipid - metoda	
	lecitin - pyren	DPPC - perylen
bez HA	5,6 ± 1,0	0,8 ± 0,1
73 kDa HA 1 g.dm <sup>-3</sup>	3,8 ± 0,3	0,9 ± 0,1
73 kDa HA 15 mg.dm <sup>-3</sup>	3,3 ± 0,5	1,0 ± 0,1
300 kDa HA 1 g.dm <sup>-3</sup>	3,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1
300 kDa HA 15 mg.dm <sup>-3</sup>	3,5 ± 0,3	1,4 ± 0,1
1,46 MDa HA 1 g.dm <sup>-3</sup>	3,9 ± 0,1	0,8 ± 0,1
1,46 MDa HA 15 mg.dm <sup>-3</sup>	3,8 ± 0,1	0,9 ± 0,1

Naměřené hodnoty počátku agregace jsou pro vybrané fosfolipidy uvedeny v **Tab. 2**. Pro fosfolipid lecitin je z tabulky zřejmé, že po přidavku hyaluronanu dochází u koncentrace odpovídající počátku agregace lecitinu k jejímu mírnému snížení a dochází tedy k malému ovlivnění systému. Počátky agregace lecitinu u vzorků obsahující hyaluronan se pro zvolené molekulové hmotnosti a koncentrace shodují, což by znamenalo, že molekulová hmotnost a koncentrace hyaluronanu nemají na tuto hodnotu žádný vliv. Druhým zvoleným fosfolipidem bylo DPPC. Naměřené hodnoty počátků agregace tohoto fosfolipidu naznačují, že kromě hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa a koncentraci 15 mg.dm<sup>-3</sup> přítomnost hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti a koncentraci neovlivňuje počátek agregace DPPC. Pouze u použití 300 kDa HA o koncentraci 15 mg.dm<sup>-3</sup> došlo ke zvýšení koncentrace odpovídající počátkům agregace DPPC. V posledně jmenovaném systému by se dalo předpokládat, že dochází k interakcím fosfolipidu-hyaluronan, a proto by měl být tento systém dále zkoumán. Z **Tab. 2** je dále patrné, že koncentrace odpovídající počátkům agregace jsou v případě systémů obsahujících lecitin mírně vyšší v porovnání se systémy obsahujícími DPPC.

## 5. ZÁVĚR

Cílem práce byla řešena na téma interakce fosfolipid-polyelektrolyt ve vodném prostředí, návrh experimentů na přípravu systémů fosfolipid-polyelektrolyt a zjištění vlivu polyelektrolytu na agregační chování fosfolipidů.

Z fosfolipidů byly vybrány dva zástupci: 1,2-diacyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (lecitin) a 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-fosfocholin (DPPC). Jako polyelektrolyt byl použit nativní hyaluronan. Bylo sledováno agregačního chování vybraných fosfolipidů ve vodě a jeho ovlivnění přidavkem nativního hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech (73 kDa, 300 kDa a 1,46 MDa) a koncentracích ( $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  a  $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Toto chování bylo sledováno pomocí fluorescenční spektroskopie za využití pyrenu a peryleny jako fluorescenčních sond schopných penetrovat do hydrofobních kavit formovaných agregátů.

V případě lecitinu bez a v přítomnosti hyaluronanu bylo možné kromě koncentrace odpovídající počátku agregace stanovit i kritickou agregační koncentraci, jelikož naměřená data získaná z emisních spekter pyrenu pro lecitin mohla být vyhodnocena na základě proložení daných závislostí Boltzmannovou křivkou. Lecitin tedy vykazoval chování podobné klasickým tenzidům a lišil se tak od druhého zvoleného fosfolipidu, kterým byl DPPC. U tohoto fosfolipidu se v průběhu práce vyskytl při interpretaci dat získaných z emisních spekter pyrenu problém. Získané závislosti v tomto případě nemohly být vyhodnoceny předchozím proložením, protože vzorky o vysoké koncentraci DPPC byly velmi zakalené a ani korekce či kompenzace blankem neumožnily získat data, která by měla charakter Boltzmannovy křivky. Z tohoto důvodu byla zvolena další fluorescenční sonda, kterou byl perylen. Naměřená data z perylenových emisních spekter posloužila k určení počátku agregace DPPC ve vodě a poté po přidavku hyaluronanu. Na základě těchto zjištění byly pro srovnání agregačního chování nejprve samotného lecitinu a DPPC ve vodě a následně v přítomnosti hyaluronanu využity hodnoty odpovídající počátkům agregace daných fosfolipidů.

Hodnota kritické agregační koncentrace u lecitinu ve vodě byla stanovena na  $19,7 \pm 4,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , přičemž počátek agregace odpovídal koncentraci  $5,6 \pm 1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Bylo zjištěno, že přídavek hyaluronanu k lecitinu pouze mírně snižuje hodnotu počátku agregace a CAC lecitinu. Počátky agregace a kritické agregační koncentrace lecitinu v přítomnosti hyaluronanu si pro zvolené molekulové hmotnosti a koncentrace odpovídají, což by znamenalo, že molekulová hmotnost a koncentrace hyaluronanu nemají na tuto hodnotu žádný vliv.

Pro DPPC ve vodě bylo možno stanovit pouze koncentraci odpovídající počátku agregace, která byla  $0,8 \pm 0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Naměřené hodnoty počátků agregace tohoto fosfolipidu v přítomnosti HA o zvolených molekulových hmotnostech a koncentracích naznačují, že kromě hyaluronanu o molekulové hmotnosti 300 kDa a koncentraci  $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  přídavek hyaluronanu o různé molekulové hmotnosti a koncentraci neovlivňuje počátek agregace DPPC. Pouze u použití již zmíněné 300 kDa HA o koncentraci  $15 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  došlo ke zvýšení koncentrace odpovídající počátkům agregace DPPC. V posledně jmenovaném systému by se dalo předpokládat, že dochází k interakcím fosfolipidu-hyaluronan a proto by měl být tento systém dále zkoumán.

Závěrem lze konstatovat, že zadané cíle práce byly splněny. Byl prozkoumán vliv hyaluronanu o různých molekulových hmotnostech a koncentracích na agregační chování vybraných fosfolipidů s ohledem na využití těchto systémů jako nosičových systémů hydrofobních aktivních látek. Zároveň bylo také poukázáno na systémy, které by bylo vhodné dále a blíže prozkoumat. Případné navazující studium by mělo být zaměřeno na zkoumání vlastností hydrofobních domén vznikajících agregátů a následně schopností těchto systémů nést konkrétní hydrofobní látku.

## 6. SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] Steinbüchel, A., Vandamme, E. J., Baets, S. De: *Biopolymers: Polysaccharides I, Polysaccharides from Prokaryotes*. Vol. 5, Wiley-VCH, 2002. 532 p. ISBN 3-527-30226-3
- [2] Almond, A.: Hyaluronan. *Cellular and Molecular Life Science*, 2007, vol. 64, pp. 1591-1596. ISSN 1420-682X
- [3] Kogan, G., Šoltés, S., Stern, R., Gemeiner, P.: Hyaluronic acid: a natural biopolymer with a broad range of biomedical and industrial applications. *Biotechnology Letters*, 2007, vol. 29, pp. 17-25. ISSN 0141-5492
- [4] Vercruysse, K. P., Prestwich, G. D.: Hyaluronate Derivatives in Drug Delivery. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1998, pp. 513-555. ISSN 0743-4863
- [5] Hascall, V. C., Laurent T. C.: *Hyaluronan: Structure and Physical Properties* [online]. Dec. 15, 1997, Glycoforum. [citováno 10.2.2008]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA01/HA01E.html>
- [6] Scott, J. E.: *Secondary and Tertiary Structures of Hyaluronan in Aqueous Solution. Some Biological Consequences* [online]. Mar. 15, 1998, Glycoforum. [citováno 10.2.2008]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA02/HA02E.html>
- [7] Weigel, P. H.: *Bacterial Hyaluronan Synthases* [online]. Sep. 15, 1998, Glycoforum, [citováno 10.2.2008]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA06/HA06E.html>
- [8] Fraser, J. R. E., Laurent, T. C., Laurent, U. B. G.: Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine*, 1997, vol. 242, no. 1, pp. 27-33. ISSN 0954-6820
- [9] Svanovský, E.: Fyziologie a farmakologie kyseliny hyaluronové. *Česká a Slovenská farmacie*, 2007, roč. 56, č. 6., s. 264-268. ISSN 1210-7816
- [10] Stern, R., Csóka, A. B.: *Mammalian Hyaluronidases* [online]. June 30, 2000, Glycoforum, [citováno 15.3.2008]. Dostupný z: <http://www.glycoforum.gr.jp/science/hyaluronan/HA15/HA15E.html>
- [11] Kolman, J., Roehm, K. H.: *Color Atlas of Biochemistry*. 2nd edition, Georg Thieme Verlag, 2005. 467 p. ISBN 3-13-100372-3
- [12] Berg, J. M., Tymoczko, J. L., Stryer, L.: *Biochemistry*. 5th ed., W. H. Freeman, 2002. 974 p. ISBN 0-7167-4684-0
- [13] Murray, R. K., Granner, D. K., Mayes, P. A., Rodwell, V. W.: *Harperova biochemie*. 1. vydání, H and H, 1998. 872 s. ISBN 80-85787-38-5

- [14] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.: *Základy buněčné biologie: Úvod do molekulární biologie buňky*. Espero Publishing, 1998. 630 s. ISBN 80-902906-0-4
- [15] Němcová, I., Čermáková, L., Rychnovský, P.: *Spektrometrické analytické metody I*. 1. vyd., Karolinum, 1997, 166 s. ISBN 80-7184-365-2
- [16] Šimsa, D., Skopal, J.: Chemická luminiscence luminolu a jeho syntéza ze snadno dostupných chemikálií. *Chemické Listy*, 2008, vol. 102, s. 1017-1019. ISSN 1213-7103
- [17] Valeur, B.: *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. WILEY-VCH Verlag GmbH, 2001. 399 p. ISBN 3-527-29919-X
- [18] Lakowicz, J. R.: *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd edition, Springer, 2006, 954 p. ISBN 0-387-31278-1
- [19] Klán, P.: *Organická fotochemie*. 1. vyd., Masarykova univerzita, 2001, 121 s. ISBN 80-210-2526-3
- [20] Fišar, Z.: Fluorescenční spektroskopie v neurovědách [online]. c2003. Dostupný z: <http://psych.lf1.cuni.cz/fluorescence/Default.htm>
- [21] Preisler, J.: Metody chemického výzkumu – fluorescence [online]. 2007. Dostupný z: <http://bart.chemi.muni.cz/courses/Metody%20Chem%20vyzkumu%20Fluo%202007.pdf>
- [22] Pasquali-Ronchetti, I., Quaglino, D., Mori, G., Bacchelli, B., Ghosh, P.: Hyaluronan-Phospholipid Interactions. *Journal of Structural Biology*, 1997, vol. 12, pp. 1-10. ISSN 1047-8477
- [23] Bray, B. A.: The Role of Hyaluronan in the Pulmonary Alveolus. *Journal of Theoretical Biology*, 2001, vol. 210, pp. 121-130. ISSN 0022-5193
- [24] Steffan, G., Wulff, S., Galla, H. J.: Divalent cation-dependent interactions of sulfated polysaccharides with phosphatidylcholine and mixed phosphatidylcholine/phosphatidylglycerol liposomes. *Chemistry and Physics of Lipids*, 1994, vol. 74, pp. 141-150. ISSN 0009-3084
- [25] Ghosh, P., Hutadilok, N., Adam, N., Lentini, A.: Interactions of hyaluronan (hyaluronic acid) with phospholipids as determined by gel permeation chromatography, multi-angle laser-light-scattering photometry and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 1994, vol. 16, pp.237-4. ISSN 0141-8130
- [26] Nitzan, D. W., Nitzan, U., Dan, P., Yedgar, S.: The role of hyauronic acid in protecting surface-active phospholipids from lysis by exogenous phospholipase A<sub>2</sub>. *Rheumatology*, 2001, vol. 40, pp. 336-340, ISSN 1462-0324
- [27] Taglienti, A., Cellesi, F., Crescenzi, V., Sequi, P., Valentini, M., Tirelli, N.: Investigating the Interactions of Hyaluronan Derivatives with Biomolecules. The Use of



- Diffusional NMR Techniques. *Macromolecular Bioscience*, 2006, vol. 6, pp. 611–622, ISSN 1616-5195
- [28] Forsey, R. W., Fischer, J., Thompson, J., Stone, M. H., Bell, C., Ingham, E.: The effect of hyaluronic acid and phospholipid based lubricants on friction within a human cartilage damage model. *Biomaterials*, 2006, vol. 27, pp. 4581-4590, ISSN 0142-9612
- [29] Huang, S., Ling, P., Zhang, T.: Oral absorption of hyaluronic acid and phospholipids complexes in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 2007, Vol. 13, pp. 945-949, ISSN: 1007-9327
- [30] Aguiar, J., Carpena, P., Molina-Bolívar, J.A., Carnero Ruiz, C.: On the determination of critical micelle concentration by the pyrene 1:3 ration method. *Journal of Colloid and Interface Science*, 2003, Vol. 258, pp. 116–122. ISSN 0021-9797
- [31] Oficiální stránky firmy Sigma Aldrich. *Product information sheet* [online]. Citováno 10.4.2010. Dostupné z: [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/p3556pis.Par.0001.File.tmp/p3556pis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/p3556pis.Par.0001.File.tmp/p3556pis.pdf)
- [32] Wu, Y., Wang, T.: Soybean lecithin fractionation and functionality. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2003, vol. 80, pp 319-326. ISSN 1558-9331
- [33] Palacios, L. E., Wang, T.: Egg-yolk lecithin fractionation and characterization. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2005, vol. 82, pp 571-578. ISSN 1558-9331
- [34] Shchipunov, Yurii A.: Lecitin. *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, Vol. 5, Second edition, pp. 3299-3318. ISBN: 978-0-8493-9615-1
- [35] Oficiální stránky firmy Avanti polar lipids [online]. Citováno 15.4.2010. Dostupné z: [http://avantilipids.com/index.php?option=com\\_content&view=article&id=216&Itemid=206&catnumber=850355](http://avantilipids.com/index.php?option=com_content&view=article&id=216&Itemid=206&catnumber=850355)
- [36] Exerowa, D., Todorov, R., Nikolov, L.: Amphiphile bilayer films from DPPC: bilayer lipid membranes and Newton black films. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 2004, vol. 250, pp. 195-201. ISSN 0927-7757.

## 7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

CAC	kritická agregační koncentrace
CD44	<i>clusters of differentiation 44</i> (specifický receptor)
Da	1 Dalton (jednotka molekulové hmotnosti, 1/12 atomové hmotnosti uhlíku $^{12}\text{C}$ , $1\text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27}\text{ kg}$ )
DPPC	dipalmitoylfosfatidylcholin
ECM	extracelulární matrix
<i>EmPI</i>	emisní polaritní index pyrenu
<i>E/M</i>	poměr intenzity emisního pásu excimeru ku intenzitě emisního pásu monomeru pyrenu
HA	hyaluronová kyselina, hyaluronan
HYCp	hydrofobně modifikovaný derivát hyaluronanu (karboxylové skupiny hyaluronanu esterifikovány methylprednisolem)
$I_1$	intenzita fluorescence monomeru
$I_3$	intenzita fluorescence třetího vibračního pásu
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i> (specifický receptor)
LYVE-1	<i>lymphatic vessel endothelial receptor 1</i> (specifický receptor)
M	$\text{mol/dm}^3$
Mon	základní stav molekuly
Mon*	excitovaný stav molekuly
MonMon*	excimer
PLA <sub>2</sub>	exogenní fosfolipáza A <sub>2</sub>
RHAMM	<i>receptor for hyaluronan-mediated motility</i> (specifický receptor)
SAPLS	surface – active phospholipids
S <sub>0</sub>	základní stav molekuly
S <sub>1</sub>	první excitovaný singletový stav molekuly
S <sub>2</sub>	druhý excitovaný singletový stav molekuly
T <sub>1</sub>	první excitovaný tripletový stav molekuly
T <sub>2</sub>	druhý excitovaný tripletový stav molekuly
<i>Tot. int.</i>	totální integrál fluorescence z emisního spektra perylenu
UDP-GlcA	UDP-glukuronová kyselina
UDP-GlcNac	UDP- <i>N</i> -acetylglukosamin
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i> (specifický receptor)

## **8. SEZNAM PŘÍLOH**

Příloha 1: Parametry fitu pro pyrenová data

## 9. PŘÍLOHY

### 9.1 Příloha 1

*Tab. 3: Parametry fitu pro pyrenová data*

	parametry fitu pro pyrenová data	fosfolipid
		lecitin
bez HA	$x_0$	0,019
	$\Delta x$	0,280
	$A_1$	$1,465 \pm 0,014$
	$A_2$	$0,895 \pm 0,022$
	$R^2$	0,9961
HA 73 kDa 1 g.dm <sup>-3</sup>	$x_0$	0,012
	$\Delta x$	0,250
	$A_1$	$1,435 \pm 0,007$
	$A_2$	$0,909 \pm 0,010$
	$R^2$	0,9954
HA 73 kDa 15 mg.dm <sup>-3</sup>	$x_0$	0,012
	$\Delta x$	0,278
	$A_1$	$1,446 \pm 0,005$
	$A_2$	$0,904 \pm 0,008$
	$R^2$	0,9974
HA 300 kDa 1 g.dm <sup>-3</sup>	$x_0$	0,012
	$\Delta x$	0,244
	$A_1$	$1,443 \pm 0,004$
	$A_2$	$0,918 \pm 0,003$
	$R^2$	0,9986
HA 300 kDa 15 mg.dm <sup>-3</sup>	$x_0$	0,012
	$\Delta x$	0,265
	$A_1$	$1,452 \pm 0,007$
	$A_2$	$0,915 \pm 0,008$
	$R^2$	0,9977
HA 1,46 MDa 1 g.dm <sup>-3</sup>	$x_0$	0,012
	$\Delta x$	0,245
	$A_1$	$1,436 \pm 0,006$
	$A_2$	$0,914 \pm 0,009$
	$R^2$	0,9958
HA 1,46 MDa 15 mg.dm <sup>-3</sup>	$x_0$	0,013
	$\Delta x$	0,263
	$A_1$	$1,435 \pm 0,005$
	$A_2$	$0,908 \pm 0,008$
	$R^2$	0,9972